

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

Expressionsanalyse von LRPAP1 in der Larvalentwicklung des *Xenopus laevis*

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Florian Gaul
geboren am 03.06.1983 in Halle/Saale

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. Thomas Hollemann
2. Herr Prof. Dr. André Brändli (LMU München)
3. Herr Prof. Dr. Matthias Girndt (Halle)

Datum der Eröffnung: 27.05.2014

Datum der Verteidigung: 20.02.2015

Referat

Das *lipoprotein receptor-related protein associated protein 1* (LRPAP1) ist ein intrazelluläres Protein, welches als Chaperon für die Proteinfaltung und den Rezeptortransport zur Zelloberfläche für die Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie verantwortlich ist. Zwei dieser Mitglieder sind LRP5 und LRP6, welche als Schlüsselemente des Wnt-Signalweges unter anderem für die Entwicklung und Differenzierung der Vorniere des *Xenopus* von Bedeutung sind. Ein weiteres Mitglied ist Megalin, welches für die Bildung von Hirnstrukturen und die richtige Funktion von Organsystemen (u.a. der Niere) während der Embryogenese eine entscheidende Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von LRPAP1 während der Frühentwicklung des *Xenopus laevis* zu beschreiben. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob LRPAP1 eine essentielle Rolle in der Frühentwicklung der Vorniere spielt.

In RT-PCR-Studien konnte gezeigt werden, dass LRPAP1 in den Geweben aller drei Keimblätter exprimiert wird, am stärksten in der Niere, dem Gehirn und der Leber. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass LRPAP1-Transkripte bereits im unbefruchteten Ei vorkommen. Diese maternalen Transkripte zeigten sich bis zum Beginn der Gastrulation. Erst ab dem Embryonalstadium 15 wurden wieder vermehrt LRPAP1-Transkripte synthetisiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* Hybridisierungen belegen eine scharf begrenzte Expression von LRPAP1 innerhalb der Vorniere des heranwachsenden *Xenopus laevis* Embryos. Mit Hilfe von speziellen Nierensegmentmarkern, welche von Reggiani et al. 2007 und Raciti et al. 2008 im Rahmen einer umfangreichen Genexpressionsanalyse von Transportproteinen (sogenannte *solute carrier*; *slc*) bestimmt wurden, konnte die Expression von LRPAP1 allen drei proximalen Vornierensegmenten zugeordnet werden.

Im Rahmen einer *loss-of-function* Untersuchung wurde durch die Injektion von *antisense* LRPAP1-Oligonukleotiden (sogenannte Morpholinos) die Proteinbiosynthese gehemmt. Dabei zeigten sich im Vergleich zur Normalentwicklung der Wildtypen weder Unterschiede in der Morphologie der Vorniere noch im Überleben der Embryonen. Daher ist anzunehmen, dass LRPAP1 keinen Einfluss auf die Frühentwicklung der Vorniere von *Xenopus laevis* hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus der frühembryonalen Forschung und Analyse der Nierenfunktion	1
1.2	LRPAP1 – Aufbau und Funktion	1
1.2.1	Molekularer Aufbau von LRPAP1	1
1.2.2	Funktionelle Bedeutung von LRPAP1	3
1.3	Ein Überblick über das Glykoprotein Megalin	3
1.4	Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie: LRP5 und LRP6	4
1.5	Überblick der Larvalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i> und dessen Nephrogenese	5
1.6	Der Wnt-/β-Catenin-Signalweg und dessen entwicklungs- physiologische Bedeutung	7
1.7	Anatomie und Physiologie der Vorniere des <i>Xenopus</i>	10
1.8	Nierensegmentmarker	12
1.9	Ziel dieser Arbeit	14
2.	Materialien	15
2.1	Organismen	15
2.2	Chemikalien	15
2.3	Medien, Puffer und Lösungen	17
2.3.1	Nährmedien und Standardlösungen	17
2.3.2	Lösungen für Embryonen Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung	18
2.3.3	Lösungen für histologische Untersuchungen	20
2.3.4	Lösungen für die Agarose- und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.3.5	Lösungen für die RNA Extraktion und Aufreinigung	21
2.4	Antikörper und Antibiotika	22
2.5	Enzyme	22
2.6	Oligonukleotide	23
2.7	Plasmid-Konstrukte	23
2.8	<i>GenBank</i> Zugangsnummern der Aminosäuresequenzen	24
2.9	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör	25

3. Methoden	27
3.1 Molekularbiologische Methoden	27
3.1.1 Phylogenetische Analyse	27
3.1.2 Restriktionsverdau	27
3.1.3 Transkription	27
3.1.4 RNA-Extraktion und RNA-Aufreinigung	28
3.1.5 cDNA-Synthese	29
3.1.6 RT-PCR	29
3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese	30
3.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA/ RNA	30
3.1.9 Herstellung der Nierenmarkersonden (Reggiani et al., 2007)	30
3.2 <i>In vivo</i> Methoden	31
3.2.1 Gewinnung und Behandlung der Embryonen, MEMFA-Fixierung	31
3.2.2 Mikroinjektionstechniken	32
3.2.3 Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung (WMISH)	32
3.2.4 Gelatine/Albumin Einbettung, Vibratomschnitte und Dokumentation	34
3.3 Proteinanalytik	35
3.3.1 <i>In vitro</i> Transkriptions- und Translations- (TnT [®] -) Test	35
3.3.2 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Aminosäuresequenzvergleich und phylogenetische Analyse von LRPAP1 in <i>Xenopus laevis</i> und anderen Spezies	36
4.2. Konservierung benachbarter Gene (Syntenieanalyse)	38
4.3 Expressionsanalyse von LRPAP1 im <i>Xenopus laevis</i>	39
4.3.1 Lokale Expression von LRPAP1 in adultem <i>Xenopus laevis</i> Gewebe	39
4.3.2 Zeitliche Expression von LRPAP1 in unterschiedlichen Embryonalstadien des <i>Xenopus laevis</i>	40
4.3.3 Whole mount <i>in situ</i> Expressionsanalyse von LRPAP1 in Embryonalstadien des <i>Xenopus laevis</i>	41
4.3.4 Lokalisation von LRPAP1 innerhalb der Vorniere des <i>Xenopus laevis</i> mittels Doppel-WMISH	46
4.4 <i>Loss-of-function</i> Analyse von <i>Xenopus laevis</i> LRPAP1	49

5.	Diskussion	57
5.1	Aminosäuresequenzvergleich und phylogenetische Untersuchung	57
5.2	Expressionsanalyse von LRPAP1	58
5.3	LRPAP1 ist nicht essentiell für die embryonale (Nieren-) Entwicklung	61
5.4	Klinischer Bezug und aktuelle Forschung	63
5.5	Ausblick	64
6.	Zusammenfassung	65
7.	Literaturverzeichnis	66
8.	Thesen	76

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A2RAP	<i>Alpha-2-Magroglobolin receptor-associated protein</i>
Abb.	Abbildung
<i>add</i>	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5 – triphosphat
[a.u.]	willkürliche Einheit (<i>Arbitrary unit</i>)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BMB	Barney-Miller Brewery-Medium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Koenzym A
d	Tag(e)
D	Aspartat
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dNTP	Desoxy- Nukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy- Thymidintriphosphat
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
D _K	Dimethylsulfoxid- Kontrolle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DT	Distaler Tubulus (Vorniere)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FA	Formaldehyd
g	Gramm
G	Guanin
Gal	Galactosidase
Gr.	Grösse
h	Stunde(n)
H	Histidin
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin
HCl	Wasserstoffchlorid (Salzsäure)

HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
Hh	Hedgehog (Signalweg)
HSPG	Heparinsulfat-Proteoglykane
I	Isoleucin
IT	Intermediärtubulus (Vorniere)
IGF-1	<i>Insulin-like-growth-factor1</i>
k	Kilo- 10^{-3}
K	Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria- Bertani
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LRP	<i>Lipoprotein receptor- related protein</i>
LRPAP1	<i>Lipoprotein receptor- related protein associated protein 1</i>
m (Prefix)	Milli- 10^{-3}
m	Meter
M	Molare Masse
mA	Milliampère
MAB	MAB-Medium
MBS	MBS-Medium
MEM	MEM-Salze
MESD	<i>Mesoderm Development Candidate 2</i>
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
MO	Morpholino (-Oligonukleotide)
MRAP	<i>Alpha-2-Magroglobulin receptor-associated protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Mitochondrium
n	Nano- 10^9
NF	Stadieneinteilung von <i>Xenopus laevis</i> nach Nieuwkoop und Faber, 1994
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (Farbstoff)
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p	Pico- 10^9
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCP	<i>Planar cell polarity</i> (planare Zellpolarität)
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PT	Proximaler Tubulus (Vorniere)
PTC	Patched
PTW	PTW-Puffer
R	Arginin
Ref.	Referenz
RAP	<i>Receptor associated protein</i>

rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Revolutions per minute of rotor</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Slc	<i>Solute carrier</i> (Transportproteine)
Smo	Smoothend
SSC	<i>Saline sodium citrate</i> -Puffer
SHH	Sonic Hedgehog
T	Thymin
TE	TE-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	Unit (Enzymaktivität)
UTR	<i>Untranslated region</i> (untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse/ Volumen
WMISH	Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung
XL	<i>Xenopus laevis</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	anti
μ	Mikro-10 ⁻⁶
λ	Lambda- Lichtwellenlänge
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Einleitung

1.1. *Xenopus laevis* als Modellorganismus der frühembryonalen Forschung und Analyse der Nierenfunktion

Amphibien und mit ihnen der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gelten seit langem schon als Modellorganismen der Wirbeltierentwicklung, von denen sich Rückschlüsse auf die Entwicklung der Säuger und damit des Menschen ziehen lassen. Sie eignen sich aus mehreren Gründen optimal als Modellorganismen zum Studium entwicklungsphysiologischer Prozesse der frühen Embryogenese und Organogenese. Dazu gehört, dass sich Amphibienlarven in einer durchsichtigen Hülle, welche leicht entfernt werden kann, entwickeln. Aufwändige Gerätschaften und Brutschränke für die Haltung und Kultivierung der Tiere sind nicht erforderlich. Die Eier, welche sich außerhalb des Organismus im Wasser entwickeln, sind mit circa einem Millimeter Durchmesser sehr groß, was die Beobachtung und mikrochirurgische Manipulation der Embryonen relativ einfach macht. Ein weiterer Vorteil dieses Modellsystems ist, dass der Krallenfrosch durch Injektion gonadotroper Hormone in den dorsalen Lymphsack zu jeder Jahreszeit zum Ablachen seiner Eier gebracht werden kann (Hensey et al., 2002; Hensey und Gautier, 1998; Wild et al., 2000). In neuesten Untersuchungen konnte die Expression humaner orthologer Gene in entsprechenden Nierenabschnitten von *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Mindestens elf dieser Gene sind zudem mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen des Menschen assoziiert (Raciti et al., 2008). Dies zeigt die starke Konservierung renaler Gene des *Xenopus laevis* und macht ihn in Zukunft auch zu einem hilfreichen Modellorganismus der Erforschung renaler Defekte und Erkrankungen (Raciti et al., 2008).

1.2 LRPAP1 – Aufbau und Funktion

LRPAP1 steht für *Lipoprotein receptor-related protein associated protein 1* (Synonyme: LRPAP1, *Receptor-associated protein*, RAP, *Alpha-2-Magroglobulin receptor-associated protein*, A2RAP, MRAP).

1.2.1 Molekularer Aufbau von LRPAP1

Das humane LRPAP1 ist ein 39 kDa schweres intrazelluläres Protein, welches hauptsächlich im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert ist. In geringer Anzahl konnte es auch auf der Zelloberfläche und in Endosomen nachgewiesen werden (Bu et al., 1994; Mokuno et al., 1994; Orlando et al., 1992). Das humane Gen, welches LRPAP1 codiert, ist auf dem Chromosom 4p16.3 lokalisiert (Korenberg et al., 1994). LRPAP1 ist aus drei unabhängigen

Domänen (D1, D2, D3) aufgebaut, die jeweils aus drei helikalen Bündeln bestehen und durch zwei *linker* verbunden sind (Bu et al., 1995; Lazic et al., 2003; Lee et al., 2007). Man vermutet, dass alle drei Domänen unterschiedliche Funktionen ausüben. Die C-terminale Domäne (D3) spielt bei der Proteinfaltung und dem Rezeptortransport eine wichtige Rolle. Die N-terminale Tandem-Domäne (D1D2) hingegen blockiert durch Bindung an den Rezeptor die Anlagerung der verschiedenen Liganden (Obermoeller et al., 1997). Die beiden *linker* zwischen den drei Domänen sind flexibel und ungeordnet, was nötig zu sein scheint, um eine Bindung vieler unterschiedlicher Liganden zu ermöglichen (Lee et al., 2007). Außerdem wurden, wie in Abb. 1B dargestellt ist, zwei Bindungsstellen für Megalin (zwischen den AS 85-148 und 178-248) und eine Bindungsstelle für Heparin (zwischen AS 261-323) nachgewiesen (Orlando und Farquhar, 1994).

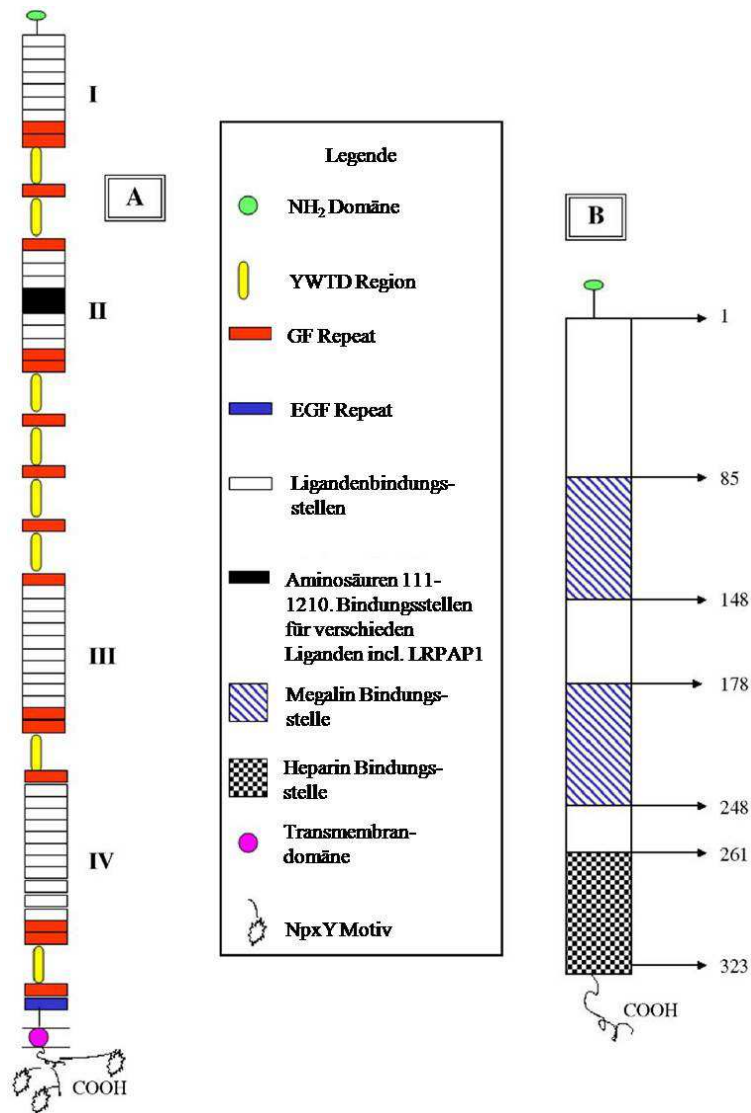


Abb. 1 Bindungsdomänen von Megalin und LRPAP1

(A) Schematische Abbildung des Proteins Megalin mit den einzelnen Domänen und der Bindungsstelle für LRPAP1 (zwischen AS 1111-1210). (B) Karte der Bindungsstellen für Liganden von LRPAP1. Man erkennt zwei Megalin-Bindungsstellen (zwischen AS 85-148 und 178-248) und eine Bindungsstelle für Heparin (zwischen AS 261-323). Grafik modifiziert nach Fischer CE und Howie SE, 2006 (b).

1.2.2 Funktionelle Bedeutung von LRPAP1

LRPAP1 fungiert unter physiologischen Bedingungen als Chaperon/Eskort-Protein und ist dabei für die Reifung einer Reihe von Mitgliedern der Low density Lipoprotein- (LDL-) Rezeptorfamilie verantwortlich. Zu denen gehören unter anderem der LDL-Rezeptor (LDLR), das LDL-Rezeptor related protein (LRP/LRP1), LRP1b, Megalin (LRP2/ gp330), LRP5, LRP6, der VLDL-Rezeptor und der Apoprotein E -Rezeptor2 (Krieger und Herz, 1994; Strickland et al., 2002). Als Chaperon verhindert LRPAP1 die frühzeitige Interaktion der Rezeptoren mit deren Liganden während der Reifung, der Modifizierung und dem Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Dadurch wird der lysosomale Abbau der Rezeptoren verhindert und der gerichtete Transport zur Zelloberfläche ermöglicht. Diese Funktion als Rezeptor-Antagonist scheint vor allem in Zellen wichtig zu sein, in denen die Expression sowohl des Rezeptors, als auch der Liganden stattfindet, um den gerichteten Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche zu ermöglichen (Bu et al., 1994; Hsieh et al., 2003; Willnow et al., 1995; Willnow et al., 1996b). Nach der Bindung reduziert LRPAP1 während des weiteren Transports seine Bindungskapazität und löst sich schliesslich durch den im Golgi-Apparat niedrigeren pH-Wert vom Rezeptor ab (Bu et al., 1995). Untersuchungen haben gezeigt, dass dabei Histidinreste in der C-terminalen Domäne (D3) als Schalter fungieren (Lee et al., 2006). Des Weiteren spielt LRPAP1, unaabhängig von der Fähigkeit die Ligandenbindung der oben genannten Rezeptoren zu blockieren, bei der Proteinfaltung dieser Rezeptoren eine wichtige Rolle (Bu, 2001).

1.3 Ein Überblick über das Glykoprotein Megalin

Megalin (Synonyme: gp330 und LRP2) ist ein 600 kDa schweres Glykoprotein, das zur Familie der Low-density Lipoprotein Rezeptoren gehört. Die Mitglieder dieser Familie agieren hauptsächlich als Typ I Membranproteine an der Zelloberfläche, wo sie für die Aufnahme einer Vielzahl wichtiger Moleküle, unter anderem Apolipoprotein I, verantwortlich sind (Hussain, 2001; Willnow et al., 1992). Eine Zusammenfassung aller bisher bekannter Liganden wurde bereits veröffentlicht (Marzolo und Farfan, 2011). Für die Proteinfaltung von Megalin im ER spielen LRPAP1 und das Protein MESD (*Mesoderm Development Candidate 2*) eine wichtige Rolle. LRPAP1 bindet dabei an spezielle cysteinreiche Regionen (sogenannte LDL-A repeats) der extrazellulären Domäne von Megalin (Bu und Marzolo, 2000), MESD an die YWTD β -Propeller/EGF Domäne (Lighthouse et al., 2011). Die Bindungsstellen für LRPAP1 befinden sich dabei zwischen den AS 1111 und 1210 (siehe Abb. 1A). Neben einer Vielzahl an unterschiedlichen Geweben wird Megalin vor allem während der

Frühentwicklung im Neuralrohr exprimiert (McCarthy et al., 2002) und spielt auch eine wichtige Rolle in der Bildung von Gehirnstrukturen (Spoelgen et al., 2005; Wicher et al., 2005; Willnow et al., 1996a). Durch Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass viele Entwicklungsanomalien, welche auf Störungen des Hedgehog- (Roelink et al., 1994) Signalwegs beruhen, denen von Megalin-defizienten Mäusen ähneln. Dabei treten vor allem ZNS-Fehlbildungen auf (McCarthy und Argraves, 2003; Willnow et al., 1996a). Dies lässt die Vermutung zu, dass Megalin einen regulatorischen Einfluss auf den Hh-Signalweg hat (Herz und Bock, 2002). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Megalin Sonic Hedgehog (Shh) spezifisch bindet (McCarthy et al., 2002). Des Weiteren wird Megalin in den proximalen Tubulusanteilen der Niere exprimiert. Es wird vermutet, dass Megalin zwar nicht direkt für die Nephrogenese benötigt wird, aber für die Funktion der Niere von großer Bedeutung ist (Fisher und Howie, 2006; Willnow et al., 1996a). Dabei spielt Megalin bei der Rückresorption filtrierter Moleküle im proximalen Tubulus (Lehste et al., 1999; Lehste et al., 2003) und wahrscheinlich auch als Selenoproteinrezeptor eine entscheidende Rolle (Chiu-Ugalde et al., 2010; Olson et al., 2008).

1.4 Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie: LRP5 und LRP6

LRP5 und LRP 6 sind, ebenso wie Megalin, Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie und agieren als Typ I Membranproteine an der Zelloberfläche und spielen aufgrund ihrer Rezeptorvermittelten Endozytose von Lipoproteinen und Protein-Liganden wichtige Rollen im Metabolismus und entwicklungsphysiologischen Prozessen (Herz und Bock, 2002; Joiner et al., 2013). LRP5 und LRP6 wurden aufgrund Ihrer Ähnlichkeit zum LDL-Rezeptur isoliert und zeigen auch untereinander eine Homologie von ungefähr 71% (Joiner et al., 2013; MacDonald et al., 2009). Auch im *Xenopus laevis* ähneln sich die beiden Proteine stark und sind in Ihren Motiven und Domänen hoch konserviert. Zudem haben Untersuchungen gezeigt, dass beide Proteine, wenn LRP5 auch etwas schwächer, in allen Stadien der Frühentwicklung des *Xenopus laevis* exprimiert sind (Houston und Wylie, 2002). Beide Proteine sind während der Embryogenese und auch in adulten Geweben weitgehend ko-exprimiert (Dong et al., 1998; Fujino et al., 2003; Hey et al., 1998; Houston und Wylie, 2002; Kato et al., 2002; Kelly et al., 2004; Kim et al., 1998; Pinson et al., 2000). Sie sind Schlüsselbestandteile des Wnt-/ β -Catenin-Signalweges (näheres dazu siehe Kap. 1.6). Laut neuesten Untersuchungen soll LRP6 eine inhibierende Wirkung auf den Wnt-/PCP-Signalweg haben (Tahinci et al., 2007). Durch Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass LRP6 (-/-) Mäuse perinatal

versterben und Hirndefekte aufweisen, wohin gegen sich LRP5 (-/-) Mäuse normal entwickeln und fruchtbar sind, allerdings im adulten Stadium Osteoporose entwickeln (Pinson et al., 2000) und metabolische Auffälligkeiten zeigen (Fujino et al., 2003). Daraus lässt sich schließen, dass LRP6 einen stärkeren Einfluss während der Entwicklung hat als LRP5.

1.5 Überblick der Larvalentwicklung von *Xenopus laevis* und dessen Nephrogenese

Nach der Fertilisation führen radiäre, holoblastische Furchungen der befruchteten *Xenopus* Eier über mehrere Stadien innerhalb weniger Stunden zu einer Blastula. Anschließend folgt die Gastrulation und es kommt zur Bildung des blasenförmigen Urdarms (Archenteron), wobei die drei Keimblätter gebildet werden. Das Entoderm, aus dem der spätere Gastrointestinaltrakt, sowie die Kiemen, die Harnblase und die großen inneren Organe Lunge, Leber und Pankreas hervorgehen. Aus dem zweiten Keimblatt, dem Mesoderm, entwickeln sich wichtige Strukturen wie Knochen, Muskeln und Leibeshöhlen. Zudem entstehen aus dem Mesoderm die spätere Niere, das Herz und die Blutgefäße. Das dritte Keimblatt ist das Ektoderm, aus dessen Zellen sich die Sinnesorgane, die Haut und das spätere Nervensystem entwickeln. Die weitere Entwicklung des *Xenopus laevis* verläuft über das Schwanzknospenstadium hin zum Kaulquappenstadium und endet nach circa einem Jahr in einem ausgewachsenen und geschlechtsreifen Frosch (Mueller W.A. und Hassel M., 2005; Nieuwkoop und Faber, 1994).

Die Nierenentwicklung von Wirbeltieren wird schrittweise in drei verschiedene Nierenformen unterteilt: Pronephros (Vorniere), Mesonephros (Urnier) und Metanephros (Nachnieren) (Saxen und Sariola, 1987). Während bei Säugetieren die Vor- und Urnieren nur übergangsweise während der Larvalentwicklung vorhanden sind und wenig funktionelle Bedeutung haben, stellt die Vorniere der Amphibien und Fische für diese das erste voll funktionsfähige Hauptausscheidungsorgan dar. Dieses ist für den heranwachsenden Embryo überlebenswichtig (Brandli, 1999; Howland, 1916; Vize et al., 1997). Obwohl sich erste immunologische Anzeichen der Entwicklung der Vorniere des *Xenopus* erst während der Organogenese (NF Stadium 21) zeigen (Abb. 2), beginnen sich schon während der Gastrulation (NF Stadium 12,5) die Zellen des intermediären Mesoderms unterhalb der Somiten 3 bis 5 zu formieren, um die Vornierenanlage zu bilden (Carroll et al., 1999; Carroll und Vize, 1999; Hausen und Riebesell, 1991; Nieuwkoop und Faber, 1994; Vize et al., 1997).

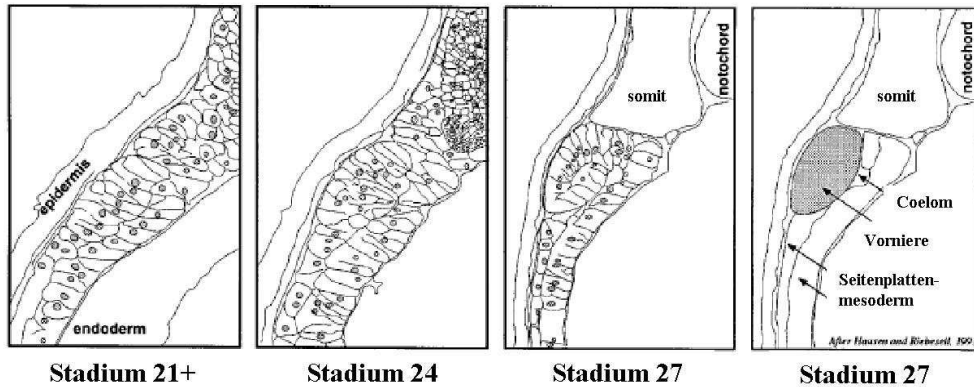


Abb. 2 Bildung der Vornierenanlage aus Zellen des intermediären Mesoderms

Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994. Abkürzungen: l.p., *lateral plate*. Grafik modifiziert nach Vize et al. 1997.

Aus der Zellanhäufung entstehen durch epithelartige Anordnung von Mesenchymzellen Hohlkugeln, die zu Epithelschläuchen nach lateral und medial auswachsen. Erste Anzeichen eines kleinen Lumens sind dabei ab NF Stadium 28 zu erkennen. Ab NF Stadium 32 weist die gesamte Struktur ein Lumen auf. Das mediale blinde Ende eines jeden Epithelschlauches wächst bis zum Coelomepithel vor, wo dann durch Zelluntergang trichterförmige Öffnungen, die Nephrostome (gr. Nierenmund), entstehen. Nach lateral fusionieren die Epithelschläuche und bilden im Folgenden die einzelnen Vornierentubulusabschnitte. Zeitgleich zu diesen Prozessen der Tubulusentwicklung, beginnen sich im NF Stadium 21 auch Zellen unterhalb der Somiten 5 bis 7 zu formieren, aus welchen sich der spätere Ductus pronephricus (Vornierengang) entwickelt (Nieuwkoop und Faber, 1994; Vize et al., 1997). Dieser fusioniert im kranialen Anteil mit dem Vornierentubulus und wächst ab NF Stadium 26 kaudalwärts, ventral der sich weiter entwickelnden Somiten, in Richtung Kloake aus (Heller und Brandli, 1997; Nieuwkoop und Faber, 1994). Diese Verlängerung des Ganges hat aktive Zellbewegungen zur Ursache (Drawbridge und Steinberg, 1996; Lynch und Fraser, 1990). Die weitere Entwicklung ist durch Kapillaraussprossung aus der dorsalen Aorta gekennzeichnet. Es bildet sich im NF Stadium 29/30 der Glomus aus, welcher einen Teil der späteren Filtrationseinheit darstellt und als Äquivalenz zum Glomerulus höherer Säugetiere anzusehen ist (Nieuwkoop und Faber, 1994). Im NF Stadium 36 bis 38 fusioniert der Vornierengang mit der Kloake (Brandli, 1999; Heller und Brandli, 1997; Nieuwkoop und Faber, 1994) und die Blutversorgung beginnt. Damit ist, ca. 31 Stunden nach der Befruchtung, das erste und überlebenswichtige Ausscheidungsorgan der sich entwickelnden *Xenopus*-Larve funktionsbereit (siehe Abb. 3).

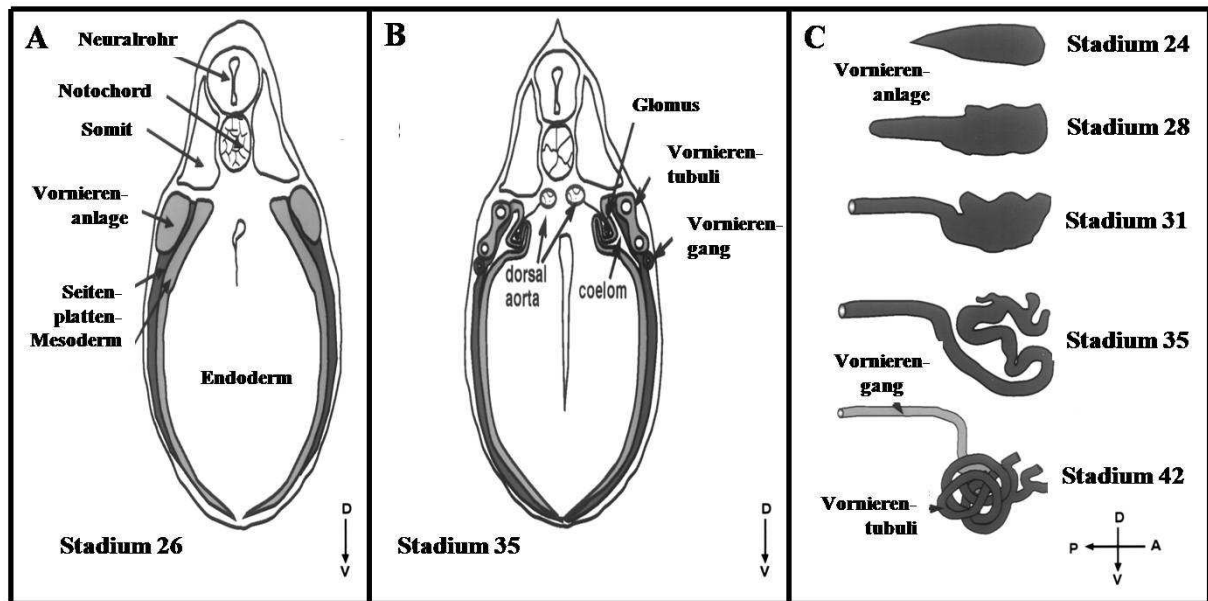


Abb. 3 Entwicklung der Vorniere des *Xenopus laevis*

(A) und (B) Entwicklung und Lagebeziehungen der Vorniere des *Xenopus laevis* anhand transversaler Vibratomschnitte. (C) Schematische Entwicklung der Vorniere des *Xenopus laevis* von der undifferenzierten Vornierenanlage zu enddifferenzierten renalen Epithelzellen (sagittale Ansichten). Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994. Abkürzungen: D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior. Grafik modifiziert nach Vize et al. 1997.

Im Folgenden übernimmt ab dem NF Stadium 53 die Urniere (Mesonephros) die Funktion und die Vorniere degeneriert. Im NF Stadium 64 ist sie nicht mehr nachweisbar (Nieuwkoop und Faber, 1994; Vize et al., 1995; Zhou und Vize, 2004).

Auf molekularer Ebene spielen eine Vielzahl an Signalwegen, darunter unter anderem der Wnt-/ β -Catenin-, der BMP- (*bone morphogenetic protein*), der FGF- (*fibroblast growth factor*) sowie der GDNF- (Lechner und Dressler, 1997) Signalweg in der Entwicklung und Differenzierung der Vorniere eine Rolle. Dabei sind vor allem die Faktoren Wnt4, Wnt11/11r, Wnt6, Bicaudal-c, Fgf8, Notch, Lim1 und Irx3 von wesentlicher Bedeutung (Kyuno et al., 2008; McLaughlin et al., 2000; Pulkkinen et al., 2008; Reggiani et al., 2007; Saulnier et al., 2002; Tran et al., 2007; Urban et al., 2006).

1.6 Der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg und dessen entwicklungsphysiologische Bedeutung

Wie in Kap. 1.5 bereits beschrieben wurde, spielt während der Entwicklung und Differenzierung der Vorniere des *Xenopus laevis* unter anderem der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg eine entscheidende Rolle. Der Signalweg ist im gesamten Tierreich hoch konserviert. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Wnt-Liganden, welche alle charakteristisch

eine N-terminale Signalsequenz sowie eine hoch konservierte Verteilung von 23-24 Cysteinresten besitzen (Logan und Nusse, 2004). In Abb. 4 ist schematisch und vereinfacht der Wnt-Signalweg abgebildet.

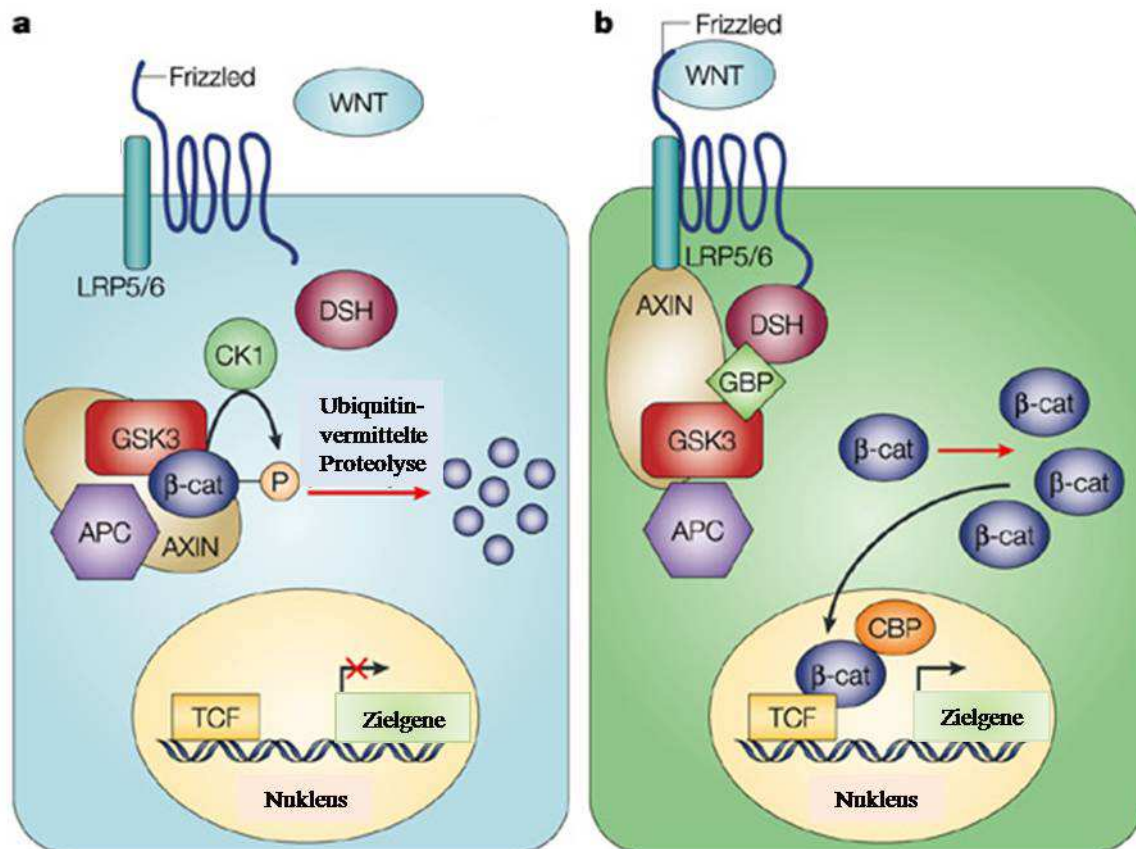


Abb. 4 Vereinfachter schematischer Überblick des Wnt-/β-Catenin-Signalwegs

(A) Im inaktiven Zustand liegt β-Catenin (β-Cat) in einem Komplex aus Axin, der Kinase GSK3 (*glycogen synthase kinsae 3 beta*) und dem Tumorsuppressor-Protein APC (*adenomatous polyposis coli*) vor (sogenannter Abbaukomplex). In diesem Komplex gebunden, wird β-Cat ständig über Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut. (B) Wenn ein Wnt-Ligand an den Transmembranrezeptor *Frizzled* und dessen Co-Rezeptor LRP5/6 bindet kommt es zur Anlagerung von Axin an LRP5/6 und das intrazelluläre Protein *dishevelled* (DSH) wird aktiviert, was beides zur Inhibierung des Abbaukomplexes führt. Dadurch wird β-Cat nicht mehr abgebaut. Es kumuliert und gelangt in den Zellkern, wo es über die Bindung an Transkriptionsfaktoren (u.a. *T cell-specific transcription factor*; TCF) die Wnt-Zielgene aktiviert. Weitere Abkürzungen: CBP (CREB-Bindeprotein), CK1 (Davidson et al., 2005), GBP (GSK3-Bindeprotein), P (Phosphat). Grafik modifiziert nach (Moon et al., 2004).

Im inaktiven Zustand liegt β-Catenin in einem Komplex aus Axin, der Kinase GSK3 (Glykogen Synthase Kinsae 3 beta) und dem Tumorsuppressor-Protein APC (*adenomatous polyposis coli*) vor. In diesem sogenannten Abbaukomplex gebunden, wird β-Catenin durch die Casein Kinase 1 (CK1) phosphoryliert und ständig über Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut. Bindet allerdings ein Wnt-Ligand an den Transmembranrezeptor Frizzeld (Fz) so kommt es zur Bildung eines Frizzled-LRP6-Co-Rezeptor-Komplexes (He et al., 2004; Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000). Danach führen, nach dem sogenannten Zwei-Signal-Modell, zwei Effekte zur Stabilisierung des β-Catenins. Zum Einen kommt es

zur GSK3 β - und CK1 γ -induzierten Phosphorylierung spezifischer Regionen der intrazellulären Domäne von LRP6 (sogenannte PPPSP-Regionen). Dadurch kommt es zur Rekrutierung von Axin zur Plasmamembran und schließlich zur Bindung von Axin an LRP5 und LRP6 (Mao und Niehrs, 2003; Mao et al., 2001; Tamai et al., 2004; Zeng et al., 2005), was den Zerfall des Abbaukomplexes zur Folge hat. Zum anderen führt eine Phosphorylierung des intrazellulär gelegenen Proteins *dishevelled* (DSH) zu dessen Aktivierung (Katanaev et al., 2005). Dieses bindet an den Abbaukomplex und inhibiert über einen noch unbekanntem Mechanismus ebenfalls den Abbau von β -Catenin. Beide Co-Rezeptor-induzierten Mechanismen führen letztendlich zur Akkumulation von β -Catenin in der Zelle, welches im weiteren Verlauf in den Zellkern gelangt und dort über die Bindung an spezifische Transkriptionsfaktoren (Tcf/Lef; *T cell-specific transcription factor/ lymphoid enhancer-binding factor*) die Wnt-Zielgene (u.a. Cyclin D1, MT1-MMP (*membrane-type 1-matrix metalloproteinase*), MMP-7 oder Dkk-1 (Mao und Niehrs, 2003)) aktiviert (Karow, 2008).

Neben diesem β -Catenin vermittelten Signalweg gibt es noch zwei weitere Wnt-Signalwege, welche in weiten Teilen noch unerforscht sind und nur schwer von einander abgegrenzt werden können und daher hier nur kurz erwähnt werden sollen. Dies sind der Wnt-PCP- (engl. *planar cell polarity*; planare Zellpolarität) und der Wnt-Calcium-Signalweg, bei welchen es nicht zu einer Akkumulation des β -Catenins kommt, sondern zur Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Mechanismen die zur Aktivierung der Zielgene führen.

Die Wnt-Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung entwicklungsphysiologischer Prozesse, von der Strukturierung des Embryos und der Bildung von Geweben und unterschiedlichen Zell-Typen, bis hin zur Regulierung der Zellbewegung, der Polarität und Achsenformierung sowie der Leitung von Axonen und Bildung von Synapsen (Logan und Nusse, 2004; Moon et al., 2004; Packard et al., 2003; Strutt, 2003; Veeman et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einige Gene des Wnt-Signalwegs in der Krankheits- und Tumorentstehung involviert sind und sich damit mögliche neue therapeutische Angriffspunkte ergeben (Moon et al., 2004).

1.7 Anatomie und Physiologie der Vorniere des *Xenopus*

Die Funktionseinheit der Niere aller Wirbeltiere ist das Nephron. Im Gegensatz zur adulten Niere, welche mehrere Millionen Nephrone besitzt, ist die Vorniere des *Xenopus* ein paariges Organ. Dieses besteht jeweils nur aus einem einzigen Nephron (Kyuno et al., 2008; Saxen und Sariola, 1987), das grundsätzlich aus drei Komponenten aufgebaut ist: dem Nierenkörperchen, den Nierentubuli und dem Nierengang. Die Abb. 5 zeigt den Aufbau der Vorniere des *Xenopus laevis*.

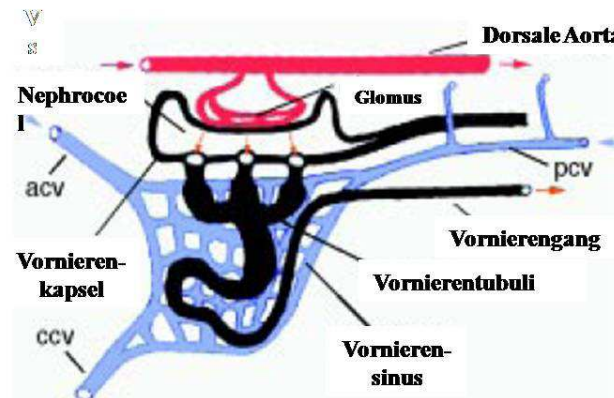


Abb. 5 Anatomischer Aufbau der Vorniere des *Xenopus laevis*

Der Glomus zweigt aus der dorsalen Aorta aus und bildet die Filtrationseinheit der Vorniere. Das Filtrat wird im Nephrocoel aufgefangen und gelangt über die Nephrostome in das Tubulussystem. Dort erfolgt die selektive Reabsorption von Nährstoffen und Salzen, welche über das Kapillarnetzwerk (den Vornierensinus) in das venöse System gelangt. Das verbleibende Filtrat gelangt über das weitere Tubulussystem und den Vornierengang zur Kloake, wo die Ausscheidung erfolgt. Abkürzungen: acv, Vena cardinalis anterior; ccv, Vena cardinalis communis; pcv, Vena cardinalis posterior. Grafik modifiziert nach Brändli 1999.

Das Vornierenkörperchen besteht aus dem Glomus, welcher für die Blutversorgung zuständig ist und der Vornierenkapsel, welche aus einem viszeralen und einem parietalen Blatt aufgebaut ist. Diese beiden Blätter bilden in einer Art Schleife die Filtrationseinheit der Vorniere, das sogenannte Nephrocoel. Über die trichterförmigen Nephrostome gelangt das Filtrat durch Ziliarbewegung über das Tubulussystem, in welchem die selektive Reabsorption von Nährstoffen und Salzen erfolgt, in den sich anschließenden Vornierengang und wird so Richtung Kloake abtransportiert (Brandli, 1999; Vize et al., 1997; Vize, 2003). Das Tubulussystem kann in die einzelnen funktionell verschiedenen Segmente proximaler, intermediärer, distaler und Verbindungstubulus (früher als Vornierengang bezeichnet) unterteilt werden (Raciti et al., 2008; Zhou und Vize, 2004). Diese Einteilung (siehe Abb. 6B) ist nicht nur funktionell bedingt, sondern beruht auch auf den unterschiedlichen Zellmorphologien der einzelnen Segmente (Mobjerg et al., 2000) und der Expression spezifischer Segmentgene.

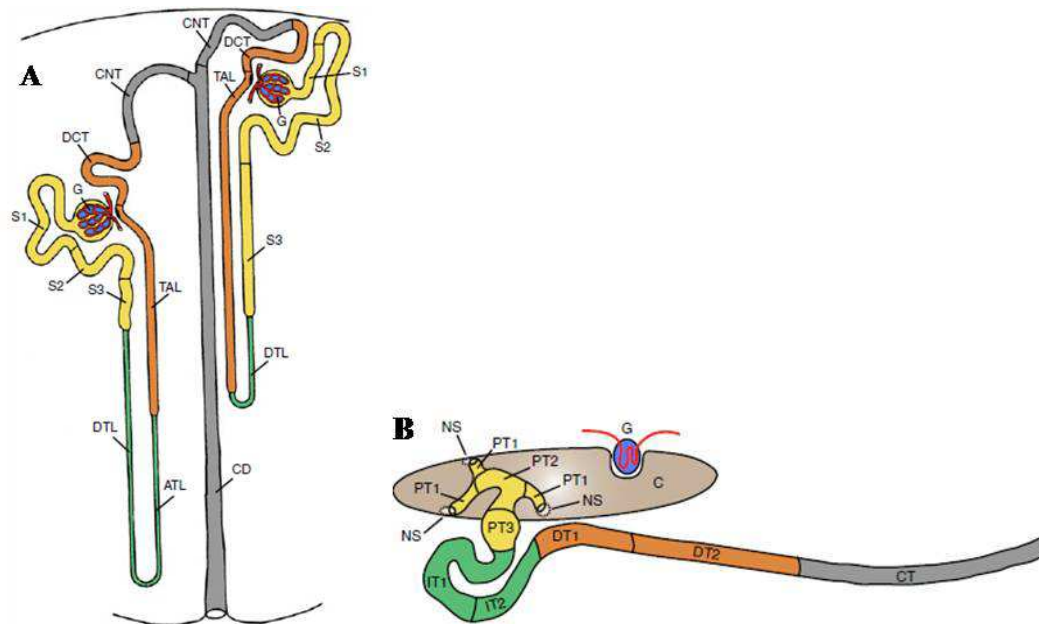


Abb. 6 Segmentaler Aufbau der Vorniere des *Xenopus* und der Nachniere der Säugetiere

Die spezifischen Farben zeigen die analogen Segmente auf Grundlage eines Vergleichs der Expression spezifischer Markergene zwischen beiden Spezies (Raciti et al. 2008).

(A) Darstellung zweier Nephronen einer adulten Nachniere von Säugetieren. Abkürzungen: ATL, Aufsteigender dünner Schenkel der Henle-Schleife (ascending thin limb); CD, Verbindungsgang (collecting duct); CNT, Verbindungstubulus (connecting tubule); DCT, Distaler (gebogener) Tubulus (distal convoluted tubule); DTL, Absteigender dünner Schenkel der Henle-Schleife (descending thin limb); S1, S2, und S3, Segmente des proximalen Tubulus; TAL, Aufsteigender dicker Schenkel der Henle-Schleife (thick ascending limb). Grafik modifiziert nach Raciti et al. 2008. (B) Schematischer segmentaler Aufbau der Vorniere des *Xenopus laevis* im Embryonalstadium 36 (nach Nieuwkoop und Faber, 1994). Der Proximale Tubulus kann in drei Segmente (PT1, PT2, PT3; gelb), der intermediäre Tubulus in zwei Segmente (IT1, IT2; grün) und der distale Tubulus ebenfalls in zwei Segmente (DT1, DT2; orange) unterteilt werden. Weitere Abkürzungen: C Coelomhöhle (auch Nephrocoel genannt), CT (Verbindungstubulus, *connecting tube*; grau), G Glomus, NS Nephrostom. Grafik modifiziert nach Raciti et al. (2008).

Der proximale Tubulus kann noch einmal in drei Untereinheiten (PT1, PT2, PT3) unterteilt werden und ist verantwortlich für die Reabsorption von Ionen, Aminosäuren, Glukose und Wasser (Christensen et al., 2008; Eid et al., 2002; Raciti et al., 2008; Zhou und Vize, 2004; Zhou und Vize, 2005a). Der intermediäre Tubulus ist unterteilbar in zwei Abschnitte (IT1, IT2) und ausschließlich für die Reabsorption von Salzen und Ionen zuständig. Interessanterweise exprimiert der intermediäre Tubulus Markergene, welche auch in Teilen der Henle-Schleife von Säugetieren gefunden wurden. Amphibien besitzen allerdings keine Henle-Schleife, da sie ihren Urin nicht konzentrieren müssen (Raciti et al., 2008; Reggiani et al., 2007). Der distale Tubulus, ebenfalls in zwei Untersegmente (DT1, DT2) unterteilbar, ist schließlich wichtig für die Ansäuerung des Urins, die Reabsorption von Magnesium und den Transport von Ammoniak. Er weist im Expressionsmuster ebenfalls Ähnlichkeiten zu Anteilen der Henle-Schleife von Säugetieren auf (Raciti et al., 2008; Vize, 2003; Zhou und Vize, 2004; Zhou und Vize, 2005b). Der strukturelle anatomische Aufbau aller drei

Nierenformen des *Xenopus* ist sehr ähnlich und der Grundbauplan des Nephrons entspricht dem der adulten humanen Niere (siehe Abb. 6A). Zudem lassen die ähnlichen Genexpressionsmuster aller drei Nierenformen eine starke Konservierung der Entwicklungsprozesse vermuten. Das macht, zusammen mit den oben genannten Vorteilen, den *Xenopus laevis* zum nützlichen Modell des Studiums der frühen Nierenentwicklung (Jones, 2005; Vize et al., 1997). Zudem gilt die Entwicklung der Niere durch die schematisch und gerichtet ablaufenden Induktions- und Umwandlungsprozesse schon seit langem als wichtiges Modell für die Grundlagenforschung entwicklungsbiologischer Prozesse der Organogenese (Davies und Bard, 1998; Lechner und Dressler, 1997; Muller und Brandli, 1999; Saxen und Sariola, 1987). Dies sollte in dieser Arbeit zur Analyse der Genexpression von LRPAP1 im Verlauf der Larvalentwicklung des *Xenopus laevis* genutzt werden.

1.8 Nierensegmentmarker

In einer umfangreichen Analyse der Genexpression von spezifischen Transportproteinen (sogenannte *solute carrier*; *slc*), konnten Reggiani et al. (2007) und Raciti et al. (2008) mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryonen segment-spezifische Markergene identifizieren. Dabei gleichen sich die Expressionsmuster der untersuchten Gene in den entsprechenden Nierensegmenten der Vorniere des *Xenopus* und der Nachniere der Säugetiere (siehe Abb. 6). Insgesamt konnte so ein Modell mit acht unterschiedlichen Vornierensegmenten erstellt werden, was in dieser Arbeit zur genaueren Analyse der Expression von LRPAP1 genutzt wurde. Um dabei nahezu die gesamte Vorniere abbilden zu können, wurden die Segmentmarker *slc5a2* (Expression im proximalen Tubulus PT1 und PT2), *slc7a13* (Expression im proximalen Tubulus PT3), *slc12a1* (Expression im intermediären Tubulus IT1 und IT2 und im distalen Tubulus DT1) und *pax2* (Expression in allen Segmenten der Vorniere) verwendet (siehe Abb. 7).

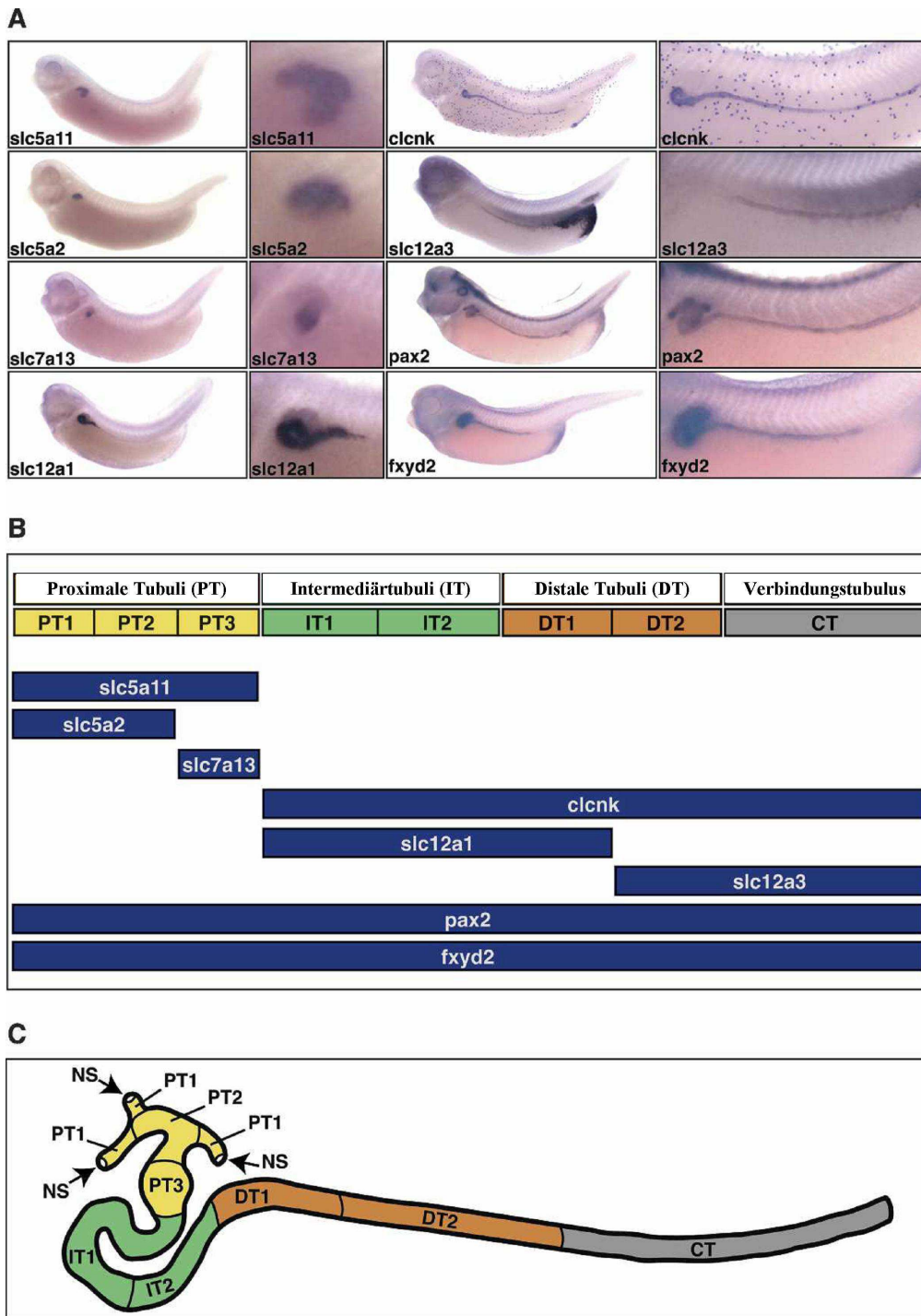


Abb. 7 Nierensegmentmarker (nach Reggiani et al. 2007 und Raciti et al. 2008)

(A) Räumliche Expression ausgewählter Nierenmarkergene mit Hilfe von whole-mount *in situ* Hybridisierungen im Stadium 36 fixierter *Xenopus laevis* Embryonen. Es sind die lateralen Ansichten mit der jeweiligen Vergrößerung der Vornierenregion gezeigt. (B) Überblick über die Expression der Nierenmarkergene innerhalb der Vorniere des *Xenopus laevis*. Die Lokalisierung der Expression ist unterhalb der entsprechenden Vornierensegmente angeordnet. (C) Schematischer segmentaler Aufbau der Vorniere des *Xenopus laevis* im Embryonalstadium 35/36 (nach Nieuwkoop und Faber 1994). Der Proximale Tubulus kann in drei Segmente (PT1, PT2, PT3; gelb), der intermediäre Tubulus in zwei Segmente (IT1, IT2; grün) und der distale Tubulus ebenfalls in zwei Segmente (DT1, DT2; orange) unterteilt werden. Weitere Abkürzungen: CT, Verbindungstubulus (connecting tube; grau); NS, Nephrostom. Grafik modifiziert nach Reggiani et al., 2007.

1.9 Ziel dieser Arbeit

Seit Beginn der 90er Jahre sind Untersuchungen zur Struktur und Funktion von LRPAP1 Gegenstand intensiver Forschung. Viele Erkenntnisse wurden dabei mit Hilfe von Untersuchungen an Modellorganismen gewonnen. Neben der Vielzahl an Liganden der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie ist LRPAP1, welches hauptsächlich im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert ist, für deren Proteinfaltung und gerichteten Rezeptortransport zur Zelloberfläche wichtig. LRPAP1 agiert dabei vermutlich als Chaperon (Birn et al., 2000).

Im *Xenopus* wurden eine Vielzahl an Genen und deren Funktionen während der Entwicklung und Differenzierung der Vorniere nachgewiesen. Viele von diesen Genen spielen auch in der Nephrogenese von Säugetieren und in der Pathogenese humaner Nierenerkrankungen eine Rolle. Im *Xenopus* ist im Rahmen der Nephrogenese unter anderem der Wnt-Signalweg mit den Wnt-Liganden Wnt4, Wnt6 und Wnt11/11R von großer Bedeutung (Wessely und Tran, 2011). Untersuchungen haben gezeigt, dass dabei LRP5 und LRP6, beides Mitglieder der Low density Lipoprotein- (LDL-) Rezeptorfamilie und Liganden von LRPAP1, eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion der Wnt-Liganden spielen.

Daher lag das Ziel dieser Arbeit in der Beschreibung der Expression von LRPAP1 im Modellorganismus *Xenopus laevis*. Es wurde sowohl das räumliche als auch das zeitliche Expressionsmuster mit Hilfe von vergleichenden *in situ* Hybridisierungen und RT-PCR Studien analysiert. Zudem sollte eine mögliche Beteiligung von LRPAP1 an der Frühentwicklung der Vorniere des *Xenopus laevis* mit Hilfe einer *loss-of-function* Analyse untersucht werden.

2. Materialien

2.1 Organismen

Adulte *Xenopus laevis* wurden von der Firma NASCO (USA) erworben und gemäß der aktuellen Tierschutzvorschriften gehalten.

Escherichia coli: Der Stamm *Escherichia coli* XL1-blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacIqZDM15Tn10 (Tetr)]) wurde für Transformationen und die Synthese von Plasmid-DNA verwendet. Für die Anzucht von *E. coli* XL1-blue wurde Luria-Bertani-Medium (Fuentealba et al., 2009), pH 7.0 verwendet. Das LB-Medium bestand aus 1 % Bakto-Pepton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl. Die Herstellung von Festmedien erfolgte durch Zugabe von 17 g Bakto-Agar pro Liter Medium.

2.2 Chemikalien

2- Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich
2- Propanol	Roth
Acetanhydrid	Sigma- Aldrich
Acetsäure	Roth
Aceton	Merck
Agarose	Roth
Aminosäurenmix	Promega
Ammoniumpersulfat	Serva
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat)	Fermentas
Boehringer Block	Sigma- Aldrich
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
BSA	Sigma- Aldrich
Calciumchloriddihydrat	AppliChem
Ca(NO ₃) ₂	Merck
CHAPS (3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat)	Roth
Chloroform	Merck
dATP (Desoxyadenosintriphosphat)	Applied Biosystems
dCTP (Desoxycytidinriphosphat)	Applied Biosystems
Dextransulfat	Merck
dGTP (Desoxyguanosintriphosphat)	Applied Biosystems
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Sigma- Aldrich
Digoxigenin-11-UTP (10 mM)	Roche
DMF (Dimethyl formamid)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxifoxid)	Roth
dNTPs	Fermentas
DTT (Dithiothreitol)	Sigma- Aldrich
dTTP (Desoxythymidinriphosphat)	Applied Biosystems
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma- Aldrich
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat)	Sigma- Aldrich
Entellan	Merck

Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Q-Biogene
FastRed Tablets	Roche
FCS (Fötale Kälberserum)	PAA
Formamid	Roth
Formaldehyd säurefrei 37%	Roth
Ficoll 400	Serva
Fluorescein-12-UTP	Roche
Gelatin	Roth
Gel Loading Buffer	Ambion
Glutaraldehyd	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
H ₂ O ₂	Roth
HCG (Humanes Choriongonadotropin)	Sigma- Aldrich
HCl	Roth
Heparin	Roth
HEPES (N2-Hydroxyethyl-piperazin-N-2-ethansulfonsäure)	Roth
Hepes Na Salz	Roth
Isopropanol	Roth
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Roth
LB Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen
L-Cysteinhydrochlorid	Roth
LiCl	Roth
MgCl	Roth
MgSO ₄	Sigma- Aldrich
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
MOPS	Q-Biogene
Mowiol	Calbiochem
NaCl	Roth
Na ₂ HPO ₄	Roth
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaHCO ₃	Merck
NaN ₃	Sigma- Aldrich
NaOH	Merck
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	Fermentas
Nilblau Chlorid	Fluka
Paraformaldehyd	Roth
Phenol	Merck
Poly-L-Lysin Solution	Sigma- Aldrich
Reverse Transkriptase Puffer	Applied Biosystems
Red-Gal	Sigma- Aldrich
Rose-Gal	AppliChem
S35- Methionin	Amersham Bio
Sodiumdodecylsulfat 20 % (SDS)	Roth
Sucrose	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Fluka
Tris	Roth

Triton® X- 100 (Alkylphenylpolyethylenglycol)	Ferak
Triethanolamin	Roth
Tween-20	Roth
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-indigo, 20 mg/ml)	Q-Biogene

Alle verwendeten Chemikalien hatten, soweit nicht anders angegeben, Analysenqualität.

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.3.1 Nährmedien und Standardlösungen

Luria-Bertani (Fuentealba et al., 2009)-Medium

Bacto-Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1% (w/v)
pH	7.5

LB-Agar

Agar in LB-Flüssigmedium	1,5% (w/v)
--------------------------	------------

Tris Puffer (autoklaviert)

Tris-HCl	1 M
pH 9,5	

TE-Puffer

Tris/HCl, pH 7,4	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM

HEPES Puffer (autoklaviert)

pH 7,5	1 M
--------	-----

2x RNA Extraktionspuffer (Stocklösung)

SDS 20 % (w / v)	1 %
EDTA 0,5 M, pH 8,0	10 mM
Tris-HCl 1 M, pH 7,5	100 mM
NaCl 5 M	100 mM
Proteinase K* (20 µg / µl)	1 µg/µl

*Erst kurz vor dem Gebrauch hinzugeben.

Phenol-Chloroform Mix

pH 8 – 8,3	1 : 1 (v / v)
------------	---------------

Penicillin / Streptomycin

Penicillin	100 U / ml
Streptomycin	10 mg / ml
Benutzte Konzentration: 1 / 1000 Verdünnung	

2.3.2 Lösungen für Embryonen und Whole mount *in situ* Hybridisierung

L-Cystein Hydrochlorid	2 %
pH 7.8 – 8.0	
Ficoll	10 %
Human chorionic gonadotropin (HCG) 10.000 U	2000 U/ml
MBS (Modified Barth Solution) 5x	
NaCl, 15 M	440 mM
NaHCO ₃ , 1 M	12 mM
KCl, 1 M	5 mM
HEPES, 1 M, pH 7.0	50 mM
MgSO ₄ , 1 M	4.1 mM
CaCl ₂ , 1 M	2.05 mM
Ca(NO ₃) ₂ , 1 M	1.65 mM
pH 7,4	
Injektionspuffer	
5x MBS	1 x
Ficoll 10 %	1 %
Nilblau Färbelösung	
Phosphatpuffer	1 l
Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Nach Erwärmung auf 60°C Zugabe von:	
Nilblau Chlorid	0,01% (w/v)
Nach Lösung über Nacht unter Rühren und anschließender Filtration war die Färbelösung zur Nutzung bereit.	
Alkalische Phosphatase Puffer (APB)	
Tris-HCl 1 M, pH 9.5	100 mM
MgCl ₂ 1 M	50 mM
NaCl 5 M	100 mM
Tween-20, 20 %	0,1 %
5x MAB Lösung (autoklaviert)	
Maleinsäure	500 mM
NaCl	750 mM
pH 7,5	
Boehringer Block (BMB) 10 % (autoklaviert)	
5x MAB	1 x
BMB	10%
Circa 1 h bei 60 °C bis vollständig gelöst, dann autoklaviert und bei -20 °C gelagert.	
Denhart´s 100x Lösung	
BSA	2 %
PVP	2 %
Ficoll 400	2 %

Hybridisierungsmix

Deionisiertes Formamid	50 %
20x SSC	5x
Torula RNA 50 mg/ ml	1 mg/ml
Heparin 10 mg / ml	100 µg/ ml
Denhart´s 100 x	1 x
Tween-20, 20 %	0,1 %
CHAPS 10 %	0,1%
EDTA 0,5 M	10 mM
Mit DEPC dH ₂ O auffüllen.	

Heparin

10 mg /ml

1 x PTw

10x PBS	1x
Tween-20, 20 %	0,1 %

PTw / Proteinase K Lösung

PTw	20 ml
Proteinase K 20 mg / ml	20 µl

20 x SSC (autoklaviert)

NaCl	0,3 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH 7,0	

2 x SSC / RNase A und RNase T1 Lösung

20 x SSC	2 x
RNase A 10 mg / ml	20 µg/ ml
RNase T1 20,000 U / ml	10 U/ ml

Bleichlösung

H ₂ O ₂	1 %
Formamid	50 %
Mit 5x SSC auffüllen.	

NBT / BCIP Färbelösung

APB	1 ml
NBT 100 mg/ ml in 70 % Dimethylformamid	1,75 µl
BCIP 50 mg/ ml in 100 % Dimethylformamid	3,5 µl

Torula RNA

10 mg/ml

Tween-20

20 %

2.3.3 Lösungen für histologische Untersuchungen

Gelatin-Albumin Lösung

10 x PBS	1x
Gelatine	2,2 g
dH ₂ O	auf 450 ml
Unter Umrühren auf 60 °C erwärmen, dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen und hinzugeben:	
Albumin	135 g
Sucrose	90 g

Durch 45 µm Filter filtrieren und bei -20 °C lagern. Zum Einbetten der Embryonen wurden 105 µl von 25 % Glutaraldehyd zu 1,5 ml Gelatin-Albumin Lösung gegeben.

10x MEM (autoklaviert)

MOPS	1 M
EGTA 0.5 M	20 mM
MgSO ₄ 1 M	10 mM

1x MEMFA

10x MEM	1 x
Formaldehyde 37 %	3,7 %

Mowiol Lösung

Mowiol	9,6 g
Glycerin	19,3 ml
dH ₂ O	24 ml
Tris 0,2 M, pH 8,5	48 ml
Unter Umrühren auf 50 °C erwärmen, dann bei 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugieren und bei -20 °C lagern.	

PBT Lösung

10x PBS	1 x
BSA	2 mg/ ml
Triton-X-100, 20 %	0,1 %

X-Gal Färbelösung

10 X PBS	5 ml
X-Gal 40 mg/ml in DMSO	1 mg/ ml
K ₃ Fe ₆ 500 mM	5 mM
K ₄ Fe ₆ 500 mM	5 mM
MgCl ₂ 1M	2 mM

2.3.4 Lösungen für die Agarose- und die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Ficoll Ladepuffer

Tris-HCl 1 M, pH 7,5	10 mM
EDTA 0,5 M	1 mM
Bromphenolblau	0,025 %
Xylencyanol	0,025 %
Ficoll 400	10%

10x TBE Puffer	
Tris	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA 0,5 M, pH 8	20 mM
Ethidiumbromid Lösung	0,5 mg/ ml
SDS-Probenpuffer	
SDS	12,5 %
Tris 2M 6,8 pH	0,3 M
Glycerol	50 %
Spatelspitze Bromphenolblau	
Mercaptoethanol	25 %
10x Elektrophoresepuffer	
Glycin	1,92 M
Tris/HCl, pH 8,8	0,25 M
SDS	1%
Sammelgelpuffer	
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,3	5 ml
APS (10 %)	30 µl
TEMED	2 µl
Trenngelpuffer	
Tris-HCl 2 M, pH 8,8	10 ml
APS (10 %)	40 µl
TEMED	4 µl
Ammoniumpersulfat (Packard et al., 2003) Lösung (in dH₂O)	10%
2.3.5 Lösungen für die RNA Extraktion und Aufreinigung	
Diethylpyrocarbonat (DEPC) – dH₂O (autoklaviert)	
Diethylpyrocarbonat	0,5 ml (0,1 %)
dH ₂ O	500 ml
Inkubation für 2 h bei 37 °C, dann autoklaviert.	
2 x Extraktionspuffer (Stocklösung)	
SDS 20 % (w / v)	5 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	2 ml
Tris-HCl 1 M, pH 7,5	10 ml
NaCl 5 M	2 ml
Extraktionspuffer (pro 10 Embryonen)	
2 x Extraktionspuffer	400 µl
DEPC-dH ₂ O	360 µl
Proteinase K* (20 µg / µl)	40 µl
*Erst kurz vor dem Gebrauch hinzugeben.	

Phenol-Chloroform Mix

Verhältnis
pH

1 : 1 (v / v)
8 – 8,3

Natriumacetat (C₂H₃NaO₂) 3 M

C₂H₃NaO₂
dH₂O

57,8 g (3 M)
auf 100 ml

10 x DNase Puffer

Tris-HCl
NaCl
MgCl₂
CaCl₂

400 mM, pH 7,9
100 mM
60 mM
1 mM

2.4 Antikörper und Antibiotika

Anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugated
Anti-fluorescein-alkaline phosphatase conjugated
Ampicillin (50 mg/ml)

Roche Biochemicals
Roche Biochemicals
Sigma- Aldrich

2.5 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme sind nach den Herstellervorschriften mit den mitgelieferten Reaktionspuffern eingesetzt worden:

DNase I (RNase-frei), 2 U/ µl
Proteinase K
Restriktionsenzyme
RNase A (10 mg/ml)
RNase T1
RNase Out Ribonuclease Inhibitor
Reverse Transkriptase
SP6 RNA-Polymerase (50 U/µl)
T3 RNA-Polymerase (50 U/µl)
T7 RNA-Polymerase (50 U/µl)
Taq DNA-Polymerase (+ KCl, – MgCl₂; 5U/µl)

Applied Biosystems Ambion
Merck
Fermentas
Fermentas
Sigma- Aldrich
Invitrogen
Applied Biosystems
Stratagene
Stratagene
Stratagene
Fermentas

2.6 Oligonukleotide

- **Oligonukleotide für PCR**

Die Oligonukleotide wurden über Sigma-Aldrich bezogen und in dH₂O gelöst, um ein 100 µM Stocklösung zu erhalten. In den folgenden Sequenzen steht „f“ für den „forward“ und „r“ für den „reverse“ Primer, „seq“ zeigt die Primer, die für die Sequenzierungen verwendet wurden.

Lrpap1-f	5'-GCAAAGAATCTGGCCTTCTG-3'
Lrpap1-r	5'-TGTCCCAAAACAGCAAAAACA-3'
H4-f	5'-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3'
H4-r	5'-ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT-3'
ODC-f*	5'-GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC-3'
ODC-r*	5'-TTCGGGTGATTCCCTTGCCAC-5'
SP6-seq	5'-TTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'
T7-seq (pGEM-T)**	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3'
T7-seq (pCS2+)***	5'-TCTACGTAATACGACTCACTATAG-3'
T3-seq	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

*: (Heasman et al., 2000)

,*: T7 Primer jeweils für pGEM-T und pCS2+ Vektoren

- **Antisense Morpholino Oligonukleotide (MO)**

Die Morpholino Oligonukleotide wurden von Gene Tools (USA) bezogen und in RNase-freiem H₂O gelöst, um eine Stock-Lösung in der Konzentration von 1 mM zu erhalten.

Standard Kontroll MO	5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'
xl_lrpap1 MO	5'-CCCGTAACACTTCCCTGACATCGTA -3'

2.7 Plasmid-Konstrukte

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit zur RNA-Synthese verwendet. Die Restriktionsenzyme, welche zur Linearisierung der DNA nötig waren, und die RNA Polymerasen, welche der *in vitro* Transkription dienen, sind ebenso aufgelistet:

Tabelle 1 Plamid-Konstrukte für die Whole mount *in situ* Hybridisierung

Plasmid	Restriktionsenzym	RNA Polymerase
XL-LRPAP1 (pCMV-Sport6)	SalI	T7
Pax2-A (pCMV-Sport6)	EcoRV	T7
MGC83377 (pCMV-Sport6) – slc5a2	SalI	T7
MGC68673 (pCMV-Sport6) – slc7a13	SalI	T7
XL027f19 (pBlueScript SK-) – slc12a1	NotI	T7

Tabelle 2 Plasmidkonstrukte für die Mikroinjektion der Embryonen

Plasmid	Restriktionsenzym	RNA Polymerase
β-Galactosidase (1D1, pCS2+)	NotI	SP6 (Ambion Kit)

2.8 GenBank Zugangsnummern der Aminosäuresequenzen

Die GenBank Zugangsnummern (*accession numbers*) der in Abb. 8 und Abb. 9 aufgeführten Aminosäuresequenzen von LRPAP1 unterschiedlicher Spezies sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 3 GenBank *accession numbers* der Aminosäuresequenzen von LRPAP1 unterschiedlicher Spezies

Abkürzung	GenBank <i>accession number</i>	Organismus (Spezies)	Dt. Übersetzung
ag LRPAP1	XP_313261.4	<i>Anopheles gambiae</i>	Stechmücke
bt LRPAP1	NP_001073694.1	<i>Bos taurus</i>	Hausrind
ce LRPAP1	NP_506187.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Fadenwurm
dm LRPAP1	NP_649950.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Schwarzbäuchige Taufliege
dr LRPAP1	NP_958463.1	<i>Danio rerio</i>	Zebrafisch
gg LRPAP1	NP_990393.1	<i>Gallus gallus</i>	Haushuhn
hs LRPAP1	NP_002328.1	<i>Homo sapiens</i>	Mensch
mm LRPAP1	NP_038615.2	<i>Mus musculus</i>	Hausmaus
mm2 LRPAP1	XP_001085674.1	<i>Macaca mulatta</i>	Rhesusaffe
pa LRPAP1	NP_001125136.1	<i>Pongo abelii</i>	Sumatra-Orang-Utan
pt LRPAP1	XP_517082.2	<i>Pan troglodytes</i>	Gemeiner Schimpanse
rn LRPAP1	NP_001162584.1	<i>Rattus norvegicus</i>	Wanderratte
sc LRPAP1	NP_001106907.1	<i>Sus scrofa</i>	Wildschwein
xl LRPAP1	AAH54293.1	<i>Xenopus laevis</i>	Afrikanischer Krallenfrosch
xt LRPAP1	NP_001090847.1	<i>Xenopus tropicalis</i> (<i>Silurana tropicalis</i>)	Tropischer Krallenfrosch

2.9 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör

Einwegpipetten und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Eppendorf erworben.	
Einmalspritzen Injekt® 2/5/10/20 ml und Kanülen	Braun, Deutschland
Filter Minisart® 0,45 µm; 0,80 µm	Sartorius, Deutschland
Nitrocellulose-Transfermembran	Loewe Biochemica, Deutschland
Skalpell-Klingen steril, Heinz	Herenz, Deutschland
Einbettungsmulden 0,6 x 1,2 cm	Polysciences, USA
Pipetman P10, 20, 200, 1000	Gilson S.A.S., Frankreich

PCR Thermocycler

Tpersonal Thermocycler, TGRADIENT Thermocycler	Biometra, Deutschland
--	-----------------------

Geldokumentation

Imager (Gel-Dokumentationsanlage GelDoc XR)	BIO RAD, USA
---	--------------

Spectrophotometer

NanoDrop® Spectrophotometer ND-100 peQlab	Biotechnology, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf, Deutschland

Elektroporator

Electro Square Porator TM ECM830	BTX, Deutschland
----------------------------------	------------------

Histologische Gerätschaften

Vibratom Leica VT1000 S	Leica Microsystem, Deutschland
Microtom Leica RM2066	Leica Microsystem, Deutschland

Microinjektion

Microinjector: PV820 Pneumatic Picopump	Helmut Saur, Deutschland
Nadelziehgerät: PN-30	Narishige, Japan

Mikroskope, Kamera

Zeiss Stemi 2000	Carl Zeiss, Deutschland
Olympus SZX12	Olympus Microscopy, Japan
Leica DMR	Leica Microsystem, Deutschland
iNTAS MS 500	iNTAS, Deutschland

Kits

Alle verwendeten Kits sind nach den Herstellerangaben verwendet worden:

PCR- Purification Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
GeneAmp®RNA PCR Core Kit	Roche
SP6 mMessage mMachine Kit	Applied Biosystems Ambion

Software

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) National Institute for Health, USA
ChemiDoc XRS Geldokumentation
DNASTAR Lasergene® 9 Core Suite (Testversion)
Genetyx Application Software Development, Japan
Microsoft Office 2004/2007 Microsoft, USA
Microsoft Windows XP/7 Microsoft, USA
Photoshop 7.0/PS Adobe Systems, USA
Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) Whitehead Institute for Biomedical Research, USA
QCapture Pro 5.1 QImaging, USA
ImageJ 1.41, USA
GraphPad Prism 5 Software, USA

Onlinedatenbanken

PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), USA
XENBASE© (www.xenbase.com)
GeneCards® (www.genecards.org)
Metazome 3.0 (www.metazome.net)
Pfam Sequence Search des Sanger Institutes (<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>)
ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)
ScanSite des Massachusetts Institute of Technology (<http://scansite.mit.edu/>)
SMART Sequence Analysis der Uni Heidelberg
(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Phylogenetische Analyse

Homologe Aminosäuresequenzen von LRPAP1 unterschiedlicher Spezies wurden über die GenBank Datenbank ermittelt. Mittels MegAlign (DNASTAR, USA) wurde ein Sequenz-Alignment durchgeführt. Dabei wurde die ClustalW Methode verwendet. Anschließend wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit Hilfe des *Neighbor-Joining* Algorithmus erstellt. Die GenBank *accession numbers* der genutzten Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

3.1.2 Restriktionsverdau

Zur Linearisierung von Plasmid-Vektoren (pCS2+ und pCMV-Sport6) wurden Restriktionsenzyme (SalI, NotI, EcoRV) nach Herstellerangaben (Fermentas) benutzt. Das Gesamtvolumen des präparativen Restriktionsansatzes betrug 50 µl. Nach Inkubation für 3 h bei 37°C und anschließender DNA-Aufreinigung (PCR-Purification-Kit; QIAGEN) erfolgte eine Kontrolle der vollständigen Spaltung mittels Gelelektrophorese und die Bestimmung der Konzentration bei 280 nm mittels Photometer.

3.1.3 Transkription

- ***β-Galactosidase sense mRNA***

Zur Synthese von β-Galactosidase sense-capped RNA wurde die RNA-Polymerase SP6 nach Herstellerangaben (Ambion Kit) verwendet. Nach Inkubation für 8 Stunden bei 37°C erfolgte ein DNase-Verdau und anschließend die RNA-Aufreinigung (RNeasy mini Kit; QIAGEN) ebenfalls nach Herstellerangaben. Anschließend wurde zur Kontrolle der Reinheit und des Erfolgs der Transkription eine Gelelektrophorese durchgeführt und die optische Dichte mittels Photometer bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die Probe bei -20°C gelagert.

- ***Digoxigenin-/Fluoreszein-markierte LRPAP1 antisense mRNA***

Die Synthese Digoxigenin- bzw. Fluoreszein-markierter *antisense* mRNA, welche in *in situ* Hybridisierungen eingesetzt wurden, erfolgte nach folgendem Protokoll:

1 µg	linearisierte DNA
2 µl	10 x Transkriptionspuffer (Roche)
2 µl	Digoxigenin-11-UTP (Roche) bzw. Fluorescein-12-UTP (Roche)
1 µl	RNase OUT (Promega)
2 µl	T7 RNA Polymerase (Roche)
add to 20 µl	RNase freies H ₂ O

Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20 µl) wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein DNase Verdau, bei welchem dem Ansatz DNase I (Ambion) zugegeben und dieser Ansatz für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenaufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll. Anschließend wurde zur Kontrolle der Reinheit und des Erfolgs der Transkription eine Gelelektrophorese durchgeführt und die optische Dichte mittels Photometer bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die Probe bei -20°C gelagert.

3.1.4 RNA-Extraktion und RNA-Aufreinigung

- **RNA-Extraktion**

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden pro Stadium jeweils 10 *Xenopus*-Embryonen mit Hilfe unterschiedlicher Kanülengrößen (Gr.1, 12, 20) in 800 µl Extraktionspuffer homogenisiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Lysat wurden 800 µl Phenol hinzugegeben, kräftig geschüttelt und der Ansatz für fünf Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde der wässrige Überstand mit jeweils 800 µl Phenol-Chloroform bzw. Chloroform versetzt und durch weitere Zentrifugationsschritte die RNA mittels Zugabe von Lithiumchlorid gefällt. Nach Resuspensierung des entstandenen Pellets in TE-Puffer (pH 7,5), Zugabe von Natriumacetat und mehreren Waschschritten mittels Ethanol (70%) wurde schließlich die optische Dichte der extrahierten RNA gemessen und mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

Anschliessend erfolgte eine RNA-Aufreinigung und schließlich die Herstellung der cDNA mittels RT-PCR (siehe unten), um weitere Untersuchungen durchführen zu können.

- **RNA-Aufreinigung für die cDNA-Synthese**

Die aus *Xenopus laevis* isolierte Gesamt-RNA sollte mittels DNase-Verdau von eventuellen Verunreinigungen durch genomische DNA befreit werden. Der Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

1 µg	Proben-RNA
1 µl	10 x DNase I Puffer (Ambion)
1 µl	DNase I (Ambion)
add to 9 µl	RNase freies H ₂ O

Nach einer Inkubation der Proben bei 37°C für 30 min erfolgte die Zugabe von 1 µl 0,25 mM EDTA zum Abstoppen der Reaktion. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 65°C für 10 min, um die DNase zu inaktivieren.

3.1.5 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription wurde die mit DNase behandelte Gesamt-RNA als Matrize verwendet und in sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde das GeneAmp®RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet. Zu dem Reaktionsansatz aus dem DNase Verdau (siehe Kap. 3.1.4) wurden 1 µl Random Hexamer Primer hinzugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte die sofortige Abkühlung auf Eis, die Zugabe von 7 µl des unten aufgeführten Mastermix und die erneute Inkubation bei 37°C für 5 min. Zu diesem Ansatz wurde dann 1 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben und der Ansatz anschließend erst 60 min bei 42°C, dann nochmals 10 min bei 70°C inkubiert. Der erwähnte RT-Mastermix bestand aus folgenden Komponenten:

4 µl	5 x Reverse Transkriptase Puffer
0,5 µl	RNase Out
2 µl	dNTP- Mix (10 mM)
0,5 µl	RNase freies H ₂ O

3.1.6 RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte eingesetzt. Die PCR wurde mit Reagenzien der Firmen QBiogene, Promega und Fermentas durchgeführt. Die aufgeführten Parameter für die einzelnen PCR-Reaktionen wurden vorher mittels Gradienten-PCR bestimmt.

PCR- Mix zum Nachweis von LRPAP1 in *xl* Embryonalstadien

1 µg	Template DNA
10 pmol	Primer (LRPAP1 bzw. ODC)
1,2 mM	MgCl ₂
0,1 µM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> - Polymerase

Der Reaktionsansatz betrug 20 µl.

PCR- Mix zum Nachweis von LRPAP1 in adultem *xl* Gewebe

1 µg	Template
10 pmol	Primer (LRPAP1 bzw. Histon 4)
1,2 mM	MgCl ₂
0,1 µM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> - Polymerase (Fermentas)

Der Reaktionsansatz betrug 20 µl.

PCR- Programm:

Initialisierung	94°C	2,5 min
Denaturierung	94°C	20 s
Annealing	60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
		Zyklenzahl 28
Extension	72°C	7 min

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten wurden Agarose-flachbettgele (7 cm x 10 cm) mit einer Agarosekonzentration von 0,9-1,5 % (w/v) eingesetzt. Das Gel enthielt 0,5 ml Ethidiumbromid zur DNA-Detektion und als Gel- und Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA erfolgte bei 70-90 V. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas) und die RNA-Proben mit 10x RNA-Ladepuffer (Ambion) versetzt. Als Molekulargrößenmarker dienten 50 bp, 100 bp und 1 kb DNA-Leitern der Firma Fermentas (O'Gene Ruler DNA Ladder). Anschließend wurden die DNA-Banden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (GelDoc XR; BIO RAD).

3.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA/ RNA

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektrophotometers (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific) bestimmt. Dabei wurde jeweils 1 µl unverdünnte Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und die DNA-Konzentration bei 260 und 280 nm photometrisch gemessen. Um den Reinheitsgrad der DNA zu ermitteln, wurde das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Dieser Wert sollte für reine DNA bzw. RNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.1.9 Herstellung der Nierenmarkersonden (Reggiani et al., 2007)

- **Chemische Transformation**

100µl der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden, nachdem sie 5 min auf Eis aufgetaut wurden, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt, gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Anschließend wurden die Zellen sofort für 2 min auf Eis inkubiert, in 900 µl LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C geschüttelt. Es wurden jeweils 100 µl und 900 µl des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

- **Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midiprep)**

Zur Plasmidpräparation wurden einzelne Kolonien in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Für die Isolierung wurden 50 ml Übernachtskulturen angezogen und der QIAfilter Plasmid Midi Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zudem wurden 500 µl Kultur mit 500 µl einer 87%igen Glycerol-Stocklösung gemischt und bei -80°C gelagert.

- **Sequenzierung**

Die Sequenzierreaktion beruht auf *in vitro* DNA-Synthese durch die T7-DNA-Polymerase, bei der es zu einer statistisch verteilten Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese durch den Einbau von entsprechenden Didesoxynukleotiden kommt.

Der Reaktionsansatz betrug 10 µl und beinhaltete:

400 ng	Plasmid-DNA
1,5 µl	Sequenzierungsmix
1,5 µl	Sequenzierungspuffer
8 pmol	SP6/T7- bzw. T3/T7- Primer
add to 10 µl	dH ₂ O

Der Reaktionsansatz betrug 10 µl.

Folgende Reaktionsschritte wurden für 25 Zyklen durchgeführt:

96°C für 10 s

55°C für 15 s

60°C für 4 min

Zur Aufreinigung der Sequenzierung wurde der Ansatz mit 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M Na-Acetat und 50 µl 100 % Ethanol versetzt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Auftrennung der markierten Syntheseprodukte erfolgte im ZMG-Labor (Sequenzierservice) automatisiert unter Verwendung des ABI Prism™-Sequenziergerätes.

3.2 *In vivo* Methoden

3.2.1 Gewinnung und Behandlung der Embryonen, MEMFA-Fixierung

Zur Oozytenreifung und Stimulation der Ovulation wurden 400-800 Einheiten (IU) humanes Choriongonadotropin in den dorsalen Lymphsack weiblicher Krallenfrösche injiziert, worauf nach 10 bis 14 Stunden die spontane Eiablage erfolgte. Durch geschicktes Greifen der Frösche konnte der so genannte Klammergriff des Männchens (Amplexus) imitiert und mit Hilfe manueller Stimulation von Bauch und Flanken der natürliche Eiablagereflex des Weibchens ausgelöst werden. Auf diese Art und Weise ließen sich innerhalb weniger Minuten mehrere hundert Eier *via naturalis* gewinnen. Zur Spermengewinnung wurden die zuvor chirurgisch entfernten *Xenopus laevis* Hoden in 1 x MBS zerkleinert und anschließend mit 2 x Cystein (Yepes et al., 2003) versetzt. Dann wurden die Eier mit der Spermien suspension in 0,1 x MBS-Puffer fertilisiert. Danach wurde die schützende Gallertkapsel (*jelly coat*), mittels

2 %igem Cystein (pH 7,8 – 8,0) entfernt und die Embryonen bis zum Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums in 0,1 x MBS kultiviert. Albinoembryonen wurden anschließend mit einem Lebendfarbstoff (Nilblau) gefärbt. Je nach Ziel des Experiments wurden die Embryonen in den entsprechenden Stadien fixiert, welche unter dem Mikroskop mit Hilfe der Klassifikation der Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1994) bestimmt wurden. Es wurden pro Versuch immer nur Eier desselben Geleges verwendet.

- **MEMFA-Fixierung der *Xenopus* Embryonen**

Die Embryonen wurden in 5 ml Gewindepräparat-Gläser überführt, für 1 h in 1 x MEMFA auf einer Rotierplattform fixiert, anschließend mindestens zwei Mal für fünf Minuten in 100% Ethanol gewaschen und dann für weitere Untersuchungen bei – 20 °C gelagert. Für die X-Gal Färbung wurden die Embryonen in 1 x MEMFA für 30 Minuten fixiert, mehrmals in 1 x PBS gewaschen und schließlich in 1 x PBS bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Mikroinjektionstechniken

Zur funktionellen Genanalyse wurden *antisense* Morpholino-Oligonukleotide (LRPAP1-Morpholinos) eingesetzt, welche komplementär an mRNA-Stränge binden, diese blockieren und somit zu einem Abbruch der Translation führen. Die Injektionen von 1,6 pmol und 2,5 pmol dieser Morpholinos erfolgten in eine Blastomere im Zweizellstadium mittels Injektionsnadeln (Borosilikatkapillaren) und eines Mikroinjektors mit kalibrierbarer, zeit- und druckgesteuerter Injektion im Nanoliter-Bereich. Als Kontrolle wurden 30-50 pg β -Galaktosidase RNA ko-injiziert (Gesamt-Injektionsvolumen pro Embryo: 5 nl). Nach der Injektion mehrerer Gruppen von Embryonen erfolgte die Kultivierung.

3.2.3 Whole mount *in situ* Hybridisierung (WMISH)

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt den spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren (DNA, RNA) an Gewebeschnitten oder Embryonen und hat somit den Vorteil, dass der Nachweis in Bezug zur Morphologie gesetzt werden kann. Die Whole mount *in situ* Hybridisierung von Albino-Embryos wurde hier grundsätzlich, wie von Harland et al. (Harland, 1991) beschrieben und von Hollemann et al. (Hollemann et al., 1998) weiterentwickelt, unter Verwendung von Digoxigenin-11-UTP (Harland, 1991)- oder Fluorescein-12-UTP (FLU)-markierten *antisense* RNA Proben, durchgeführt.

- **Einfachfärbung**

Erster Tag

Die in 100 % Ethanol gelagerten *Xenopus laevis* Embryonen wurden über eine Ethanolreihe in PTw-Puffer rehydriert und anschließend stadienabhängig unterschiedlich lang mit Proteinase K behandelt (siehe Tabelle), um eine verbesserte Penetration der Sonde in das Gewebe zu ermöglichen.

Stadium	Zeit in Min
25/56	14
28	15
30	16
32/33	16
36	18
38	19
41	20
42	20

Danach wurden die Embryonen in 0,1M Triethanolamin umgepuffert und dann durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert. Anschließend erfolgte eine Refixierung mit Formaldehyd. Als nächstes wurden die Embryonen für mindestens sechs Stunden bei 65°C im Hybridisierungsmix prähybridisiert, um eine Equilibrierung des Gewebes zu ermöglichen. Danach erfolgte die Hybridisierung mit den mRNA-Sonden (Digoxigenin- oder Fluoreszeinmarkiert) über Nacht (ÜN) bei 60 °C.

Zweiter Tag

Nach mehreren Waschschritten erfolgte ein RNase-Verdau:

Reagenz	Temperatur	Zeit
500 µl Hybridisierungsmix	60°C	10 min
2 x SSC	60°C	60 min, 3x
2 x SSC + 20 µg RNase A und 10 U RNase T ₁	37°C	60 min
2 x SSC	RT	10 min
0,2 x SSC	60°C	30 min, 2x
0,2 x SSC	60°C	30 min, 2x

Danach erfolgte die Antikörperinkubation:

Reagenz	Temperatur	Zeit
1 x MAB	RT	15 min, 2x
5 x MAB + 2% BMB + Zellkulturwasser	RT	60 min
5 x MAB + 2% BMB + Zellkulturwasser + 20% Serum	RT	60 min
5 x MAB + 2% BMB + Zellkulturwasser + 20% Serum + Antidigoxigenin-/ Antifluoreszin-AK (1:5000)	RT	240 min
1 x MAB	RT	30 min, 2x
1 x MAB	4°C	ÜN

Dritter Tag

Es erfolgte die Färbung der Embryonen mit APB und NBT/BCIP auf Eis und im Dunkeln, bis eine ausreichende Farbentwicklung festzustellen war. Dann wurde die Färbung über eine absteigende Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 25%) gestoppt, die Embryonen in MEMFA fixiert und schließlich fotografisch dokumentiert.

- **Doppelfärbung**

Für eine Doppelfärbung wurden die Embryonen im Hybridisierungsschritt zusätzlich mit einer zweiten Sonde inkubiert. Danach erfolgte dann nach oben beschriebenem Protokoll die erste Antikörperinkubation mit Anti-DIG-Antikörpern. Nach mehrmaligem Waschen der Embryonen mit DEPC-H₂O und zweimaliger Inkubation mit 0,1 M Tris-HCl (Christensen et al., 2008) für 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die erste Färbung mit FastRed-Tabletten. Nach mehrmaligem Auswaschen des Farbstoffes mit 0,1 M Tris-HCl (Christensen et al., 2008) und Behandlung mit EDTA, erfolgte die erneute Umpufferung in MAB-Puffer. Anschließend wurden die Embryonen nach dem obigen Protokoll (siehe Kap. 3.2.3. „Einfachfärbung“) mit dem zweiten Antikörper (Anti-Fluoreszin-AK) inkubiert und mit APB und NBT/BCIP gefärbt. Dann wurde die Färbung wieder über eine absteigende Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 25%) gestoppt, die Embryonen in MEMFA fixiert und schließlich fotografisch dokumentiert.

3.2.4 Gelatine/Albumin Einbettung, Vibratonschnitte und Dokumentation

- **Gelatine/Albumin Einbettung**

Es wurden flexible Formen mit Einbettungsmulden von ca. 0,6 x 1,2 cm Größe verwendet. Pro einzubettendem Embryo wurden 1,5 ml des Gelatine-Albumin-Mediums in einer Mulde vorgelegt und mit 105 µl 25%igem Glutaraldehyd vermischt. Nach Erhärten dieser ersten Schicht wurden die zuvor für 15 Minuten im Gelatine-Albumin-Medium equilibrierten Embryonen darauf entsprechend platziert. Danach wurden die Embryonen mit einer zweiten Schicht der oben genannten Mischung bedeckt. Nach Aushärtung wurden die Blöcke aus der Form gedrückt und bis zum Schneiden in Kunststoffolie (feucht) oder PBS einige Tage bei 4°C aufbewahrt.

- **Vibratonschnitte**

Die histologische Untersuchung der *Xenopus laevis* Embryonen erfolgte anhand von Vibratonschnitten. Die zu schneidenden Embryonen wurden in Gelatine/Albumin-Blöcken

eingebettet (siehe oben), mit einem Vibratom (VT 1000 E; Leica) in einer Schnittdicke von 30 µm geschnitten und auf Objektträgern zur fotografischen Dokumentation ausgelegt (Holleman et al., 1996).

- **Fotografische Dokumentation**

Für die fotografische Darstellung wurde eine digitale Kamera eingesetzt. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop 6.0 / CS4.

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 *In vitro* Transkriptions- und Translations- (TnT[®]-) Test

Zur Kontrolle der verwendeten *antisense* Morpholino-Oligonukleotide wurde das *TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysat System* (Promega) verwendet. Dieses System ermöglicht die gekoppelte Transkription/Translationsreaktion von Plasmidkonstrukten. Mit entsprechenden RNA-Polymerasen wird zunächst ein Transkript der DNA erstellt, welche durch Retikulocytenlysat in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin in ein Protein translatiert wird. Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

6,25 µl	TnT [®] Retikulocytenlysat
0,5 µl	TnT [®] Reaktionspuffer
0,25 µl	TnT [®] RNA- Polymerase SP6
0,25 µl	Aminosäuremix ohne Methionin
0,25 µl	RNasin
0,5 µl	[³⁵ S]-Methionin
0,5 µg	Template DNA

Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 12,5 µl) wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die methioninmarkierten Translationsprodukte elektrophoretisch mittels eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt und per Autoradiographie detektiert.

3.3.2 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Dabei wurde das Tris-Glycin-System nach Laemmli (1970) verwendet. Zur Denaturierung wurden die Proben mit 1 Vol. 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel (4%) bei 10 mA und im Trenngel (12,5%) bei 25 mA.

4. Ergebnisse

4.1 Aminosäuresequenzvergleich und phylogenetische Analyse von LRPAP1 in *Xenopus laevis* und anderen Spezies

Um die evolutionäre Beziehung und den Grad der Konservierung der Aminosäuresequenzen von LRPAP1 verschiedener Spezies zu untersuchen, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Alle Aminosäuresequenzen wurden dafür über die *GenBank* Datenbank ermittelt (*accession numbers* siehe Kap. 2.8). Anschließend wurde mit Hilfe des Programms MegAlign (DNASTAR, USA) ein Alignment durchgeführt, bei dem diese Sequenzen mit dem offenen Leserahmen (*open reading frame*) der *Xenopus laevis* Sequenz verglichen wurden. Das Ergebnis dieses Alignments ist in Abb. 8 und der daraus resultierende phylogenetische Stammbaum in Abb. 9 dargestellt.

Die LRPAP1-Sequenzen von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* sind mit mehr als 91 % sehr ähnlich. Alle anderen untersuchten Sequenzen zeigen, mit Ausnahme von *Anopheles gambiae* (31,9%), *Drosophila melanogaster* (30,6%) und *Caenorhabditis elegans* (24,2%), eine Übereinstimmung mit Werten um 60 % (Werte siehe Abb. 8). Dies drückt sich auch im phylogenetischen Stammbaum aus, in dem diese drei Spezies evolutionär weit von den Restlichen entfernt sind. Zudem erkennt man sehr deutlich, dass die Säuger eine eigene phylogenetische Gruppe bilden. Innerhalb dieser gruppieren sich die einzelnen Ordnungen der Primaten (*Homo sapiens*, *Pongo abelii*, *Pan troglodytes* und *Macaca mulatta*), der Paarhufer (*Sus scrofa* und *Bos taurus*), der Nagetiere (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*) oder eben der Froschlurche (*Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*) untereinander.

Zudem erfolgte mit Hilfe verschiedener Online-Datenbanken (siehe Kap. 2.9) eine Analyse der Domänenstruktur von LRPAP1 (siehe dazu auch Abb. 8). Dabei konnte neben den N- und C-terminalen Proteindomänen ein Coiled Coil Motiv (AS 258-292), sowie ein HNEL-Motiv am Ende der C-terminalen Domäne identifiziert werden.

```

xl lrpap1 MSGKC..YGLFLLG.....CSLLLLVRAQAGDGAGKYSRDVN.....E..NHSEK..DSAVEFRIMRLNQLIWEKAQRLQLSSVQLTELHSDLKI 78
xt lrpap1 -R.....-C-..V.....-SV-L.....-N.....-R-..-PT.....-PA--A..... 74
hs LRPAP1 -APRR..VRS--R-LP...ALLLLL-F..GPWP-ASHG---EK.....QPKP-PKRE-GE---MEK-----H-PP-R-A---A--- 85
pt lrpap1 -APRR..VRS--R-LP...ALLLLL-F..GPWP-ASHG---EK.....QPKP-PKRE-GE---MEK-----H-PP-R-A---A--- 85
pa lrpap1 -APQR..V-S--R-LL...ALLLLL-FF-GPWP-ASHG---EK.....QPEPPPKRE-GE---MEK-----H-PP-R-A---A--- 86
mm2 lrpap1 -ASRR..L-S--R-LP...ALLLLM-FL-GPWP-ASHG---EK.....QPEPPPKRE-GE---MEK-----H-PP-R-A---A--- 86
mm lrpap1 -APRRERVSTLPRQL...LVLLLLL-M--PQPIAGHG---EK.....PEMAAKRE-GE---MEK-----K-H--P-R-A--- 88
rn lrpap1 -APLRDRVSTLPRQL...LVLLLLL-M--PQPIAGHG---EK.....PEMAAKRE-GE---MEK-----K-H--P-R-A--- 88
bt lrpap1 -ASRR..VLSG-RAVRQPPPLLLL---GPWA-AGH---EK.....PAPPSKREP-A---MEK-----N-PPLK-SD--T--- 89
sc lrpap1 -ALRR..VRAG-RELR...PLLLL---GPWP-AGHG---EK.....PAPPSKREPTG---EK-----N-P-R-S---A--- 85
dr lrpap1 .....MA---KEM.....K-ASDKSNNQ---AK---V---I-M--AP-R-S--- 55
gg lrpap1 -G.....ATRT.....LVAVMAAFLAVSTRAS--T-EA.....GLADAKRRE-G--VV---V---A-K-A--- 74
ag lrpap1 ..MPLFTRLCVI...VTV...VLVCMNH-VQSEKAHS--KHA.....ALPDS..IYEDFRNIQRP--MAK--LV-T---HR--TEPK-KS-YTE--L 84
dm lrpap1 -VRSALVVAALAS...VLLALQGVADAKKQSK---KEA-DHFFQVQVKO-KYDDPEKSIQRP--MAK--LV-A---NR--TEPK-KS-YME-- 90
ce lrpap1 .....MRNHFS.....FL-F---IG.....SAHNKKTQY-TE-I-FIY---LQHVTDRON-AR-EKE-SG 55

```

```

QEKDELNWKKLVGLDQDDGKEAKLRSLNVLLTKYGLDGKKTQT.....DSNFIKD..SKENDI.....LNDPRLEKLWNKAKTSATFSEEELESW 167
.....E.....S.....G---K..... 163
--R--A--L--E-----R-I-N--A-----DARQ..VT--SLSG..TQ-DG.....D-----H--GK-G--DK-- 173
--R--A--L--E-----R-I-N--A-----DARQ..VT--SLSG..TQ-DG.....D-----H--GK-S--DK-- 173
--R--A--L--E-----R-I-N--SA-----DARQ..VT--SLSG..TQ-DG.....D-----H--GK-S--DK-- 174
--R--A--L--K--R-I-N--A-----DA-C..VT--SLSG..TQ-DG.....D-----H--GK-S--DK-- 174
--R--E--K-----IHN--AR--R-DA-M..VH--ALNE..DTQDE.....G-----H--GK-S--DK-- 176
--R--E--G-----VHN--AR--R-DT-M..VH--ALNE..DTQDE.....G-----H--GK-S--DK-- 176
--R--FK--AE-E-E-E--V--S--A-----R-DSRV..VS--VDH..GPDDES.....E-----H--GK-S--DK-- 178
--R--FK--M-SE-E-E-----R-D.....LST-LNH..GP-D-S.....E-----HR-RA-GK-C--DK-- 172
--Q---AE-M-E-R-----NF-I-A-M--D-RT..I--RL--HEVKIG-T.....PD--K-D-----R-GK-D--QT-H 146
--S---AE-GE-----NI--M--MN--DSHI..I--TNY.....GT-S-T.....D-----S--GK-D--DK-- 163
HD-E--TY-Q--..EK-K-L--E--NKLVS-MST--LEHFDDTQDP-KYH..LA-SSDGAPKKDITYKNKSLFK-KK-N--D--ESAG--TK--DA-R 181
HD-E-IA-Q-NSQHK-K-L-ADE--KLIG-MSS-D-LEHFDDTQDP-KI..KPY-KFHDA-ER..HRNKSLFK-KK-NR--E-EI-G--TA--K-K 187
YDAIY-AS-SNK...DGTQGTKEID-IDDKLKG--E---EKAVLAFKEKYKHKNFVQQTDDNEPLPSGK...FT-QN-Q--SQ-QN-GK--QK--NA-H 149

```

```

REFVHHKEKISEYNILLDTVSV.....RTEEIHKNVISP.....DEHEIKEDILHAKHTDLKERLRSINQGYERLRKLSH 236
--LA--D.....E.....E..... 232
--L--VH--V--E-L.....E--S.....LSD--GSV--SR-E--K-----LD--RV-- 243
--L--VH--V--E-L.....E--S.....LSD--GNV--SR-E--K-----LD--RV-- 243
--L--VH--V--E-L.....E--S.....LSD--GNV--SR-E--K-----LD--RV-- 244
--L--VH--V--E-L.....E--L.....LSD--GNV--SR-E--K-----L--RV-- 244
--L-Y--Q--V--L.....A--GYE-LL-S.....MAH--S-T-IS--SE-D-----LD--V-- 246
--L-Y--H--V--L.....A--GYE-LL-S.....MTH--S-T-AS--SE-D-----LD--V-- 246
--LQ--VQ--HA--E-LG.....GA--SHE-A-G-V.....LRGVQAEA-ASR-AE-D--G--FD--RV-- 248
--L-Q--VR--E-L.....A--E--A.....MSHVA--A-RSR-SE--D--QD-S--LD--QRV-- 242
--Q--D--H--VM.....L-GDV--NV--Q--Q-M-DL--F--VT-- 215
--K--R--E.....D--K--N-S.....E-NPV--EV--N--RE--K-----F--V-- 233
E-D-QA--DV-YS--ERLGDGDDGGAAGQGSR-DDDALL-AVNDEEHDRYNEVDRAEETDRSQPGAN-QHAYLH-SNQ-R-KH-E-RDNFD--DRIAS 281
Q-D-QD-VDV-YS--ENIG.....TVDDTK-E-A-NTIEDLDTYNLISNDVNENDIKT-AQNVKSFENDLNT-RGHHTG-KDH-D--ER-VS 275
G-LKEVEQ-MRV-EDQ--DFK.....KVP..-E-S-QH.....D..IESIGD-TKK--AAN-EL-DHLDEVHRKVT 211

```

```

EGYITAREFNEPRVNDLWMDAKDAN..FSDSLELSPKEELKHFETKIEKHQHYQKQLEISHGKCLKHIADTGDKEHLMRSKEKHSMLTEKIKELGYKVKKHL 335
--F.....E--V-E--I--D..... 331
Q-S-EA-E--I--L-QS..LT-K--A-R--A--N--A-E-R-AESV-G-RVS-R--AL-EGRT--T-- 342
Q-S-EA-E--I--L-QS..LT-K--A-R--A--N--A-E-R-AESV-G-RVS-R--AL-EGRT--T-- 342
Q-S-EA-E--I--L-QS..LT-K--A-R--A--N--A-E-R-AESV-G-RVS-R--AL-EGRT--T-- 343
Q-S-EA-E--I--L-QS..LT-K--ALR--A--N--A-E-R-AESV-G-RVS-R--AL-EGRT--T-- 343
Q-GSTT-E--I--L-QS..TEK--R--A--N--Q--VESI-P-IS-N--YVL-E-T-- 345
Q-GP-T-E--I--L-QS..TEK--R--A--N--Q--VESI-P-IS-N--YVL-E-T-- 345
Q-GAET-T--L--M--S--TEK--R--V--N--Q--VESF-Q-VT-NR-RYAT-E-RT--M 347
Q-GAEA-A--M--L-RA--TQK.....A--N--Q--VESF-Q-IS-N-RYAL-E-T-- 341
--TDDS-R--IE-E-RS..L-ED-D-L--R--V--Q--E--L--Q--VEAL-E-I-N--YNT-A-AR-M--M-- 314
Q-DATS-E--I--S--TEK--R--A--H--E--EG-----N-NR--YA-E-T-- 332
K-PKSQ-D-V-K-QG-RV-LASD..AD-A-L-V--L-Y-SRLL-LR-MHAHAL-LE-H--SDAKA-T.....KLMEDN-KQTR--E-MQ 370
S-PHSQ-D-I-K-QG-RV-QAS..TVK---I-T-H--SRLL-LR-LHAHALQKE-Y-GEKVKDKSS.....RFEEMEDQL-KQTR--E-Q 366
SEEFSP.....KR-KL-QENEKLTPH--SVL-D--S--SQLK-IEFHKEEVSRLQEDAEERGRKDKSQ...VY...ENLE-SI-HEK-NR-AR--E 303

```

```

QDLTSRASRGGLQHNEL 352 ID [%]
-----R----- 348 91,7
--SG-I--A..R 357 62,9
--S-I--A..R 357 63,2
--S-I--A..R 358 62,8
--S-I--A..R 358 63,6
--S-V--A..R 360 62,8
--S-V--A..R 360 63,9
--S-I--A..R 362 58,9
--S-V--R 356 62,4
--NKL-KN----- 331 66,4
--S-I-Q----- 348 68,1
EEVER-IFK....S-- 383 31,9
ENIEKTIFK....T-- 379 30,6
KYIEEKIII....R-- 316 24,2

```

Abb. 8 Vergleich der Aminosäuresequenzen von LRPAP1 im *Xenopus laevis* mit denen anderer Spezies
Für die *Xenopus laevis* Sequenz wurde der ORF genutzt. Punkte stehen für Lücken, welche eingefügt wurden, um eine optimale Sequenzübereinstimmung zu erreichen. Identische Aminosäuren sind durch Bindestriche repräsentiert. Am Ende jeder einzelnen Sequenz ist die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in Bezug auf die von LRPAP1 des *Xenopus laevis* in Prozent aufgelistet. Farben: Rot, N-terminale Domäne (Alpha-2-MRAP_N Superfamily); Gelb, C-terminale Domäne (Alpha-2-MRAP_C Superfamily); Braun, Coiled Coil Motiv (258-292); Grün, HNEL-Motiv (ER Zielsequenz).
Abkürzungen: ag, *Anopheles gambiae*; bt, *Bos taurus*; ce, *Caenorhabditis elegans*; dm *Drosophila melanogaster*; dr, *Danio rerio*; gg, *Gallus gallus*; hs, *Homo sapiens*; mm, *Mus musculus*; mm2 *Macaca mulatta*; pa, *Pongo abelii*; pt, *Pan troglodytes*; rn, *Rattus norvegicus*; sc, *Sus scrofa*; xl, *Xenopus laevis*; xt, *Xenopus tropicalis*.

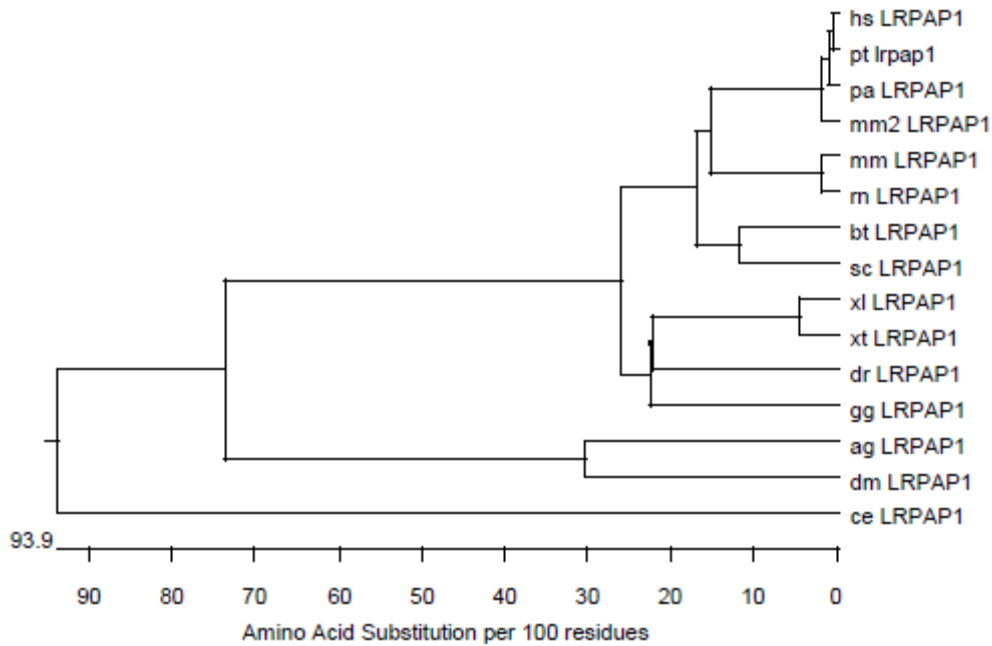


Abb. 9 Phylogenetische Stammbaumanalyse von LRPAP1 verschiedener Spezies

Die Skala zeigt den AS-Austausch pro 100 AS und beschreibt damit den Unterschied bezüglich der Ähnlichkeit der Aminosäuren in Prozent. Die vertikalen Abstände zwischen den einzelnen Ästen dienen nur der besseren Übersicht. Die GenBank *accession numbers* der einzelnen Aminosäuresequenzen sind in Kap. 2.8 aufgelistet. Für die *Xenopus laevis* Sequenz wurde der ORF genutzt; Abkürzungen: *ag*, *Anopheles gambiae*; *bt*, *Bos taurus*; *ce*, *Caenorhabditis elegans*; *dm* *Drosophila melanogaster*; *dr*, *Danio rerio*; *gg*, *Gallus gallus*; *hs*, *Homo sapiens*; *mm*, *Mus musculus*; *mm2* *Macaca mulatta*; *pa*, *Pongo abelii*; *pt*, *Pan troglodytes*; *rn*, *Rattus norvegicus*; *sc*, *Sus scrofa*; *xl*, *Xenopus laevis*; *xt*, *Xenopus tropicalis*.

4.2 Konservierung benachbarter Gene (Syntenieanalyse)

Um die unter Kap. 4.1 gezeigte Verwandtschaft von LRPAP1 innerhalb unterschiedlicher Spezies weiter zu verifizieren, wurde die Syntenie bestimmt. Darunter versteht man die in der Evolution konservierte Nachbarschaft verschiedener Gene auf einem Chromosom. Dazu wurde mit Hilfe der Onlinesoftware Metazome 3.0 ein Proteinblast der LRPAP1-Sequenz von *Xenopus laevis* durchgeführt und anschließend die Syntenie innerhalb der Gruppe der Landwirbeltiere (*Tetrapoden*) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 10 gezeigt.

Dabei erkennt man, dass sich die benachbarten Genabschnitte von LRPAP1 im Vergleich der untersuchten Spezies grundsätzlich sehr ähneln. Teilweise sind Genabschnitte ausgetauscht, in einer anderen Reihenfolge angeordnet oder fehlen ganz, eine Grundstruktur ist vergleichend aber eindeutig erkennbar.

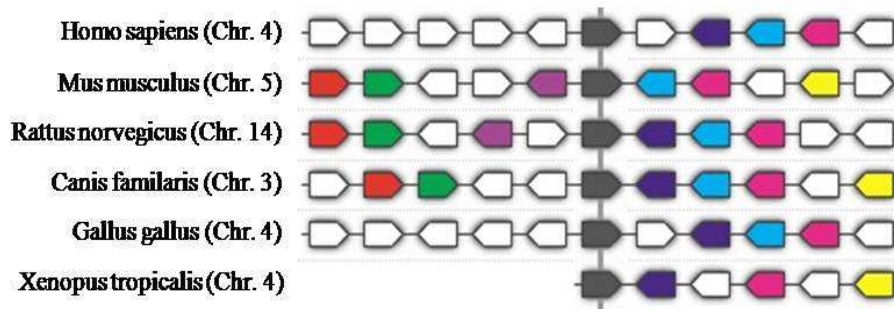


Abb. 10 Syntenieanalyse von LRPAP1 in *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris*, *Gallus gallus* und *Xenopus tropicalis*.

Schematischer Überblick über die benachbarten Gene von LRPAP1 vergleichend in den oben genannten Spezies. Konservierte Gene sind farbig, nicht konservierte Gene sind weiß dargestellt. Die Richtung der einzelnen Gene ist anhand der Pfeile dargestellt. Die Länge und Abstände zwischen den einzelnen Genen ist nicht maßstabsgetreu. Farben: grau, LRPAP1; dunkelblau, DOK7 (*downstream of tyrosinkinase 7*); hellblau, HGF-Aktivator (*hepatocyte growth factor activator*); rosa, RGS12 (*regulator of G-protein signaling 12*); rot, 2310079F23Rik (*RIKEN cDNA 2310079F23 gene*); grün, Cpz (*carboxypeptidase Z*); violett, Adra2c (*adrennergic receptor alpha 2c*); gelb, Hdh (*huntington disease gene homolog*).

4.3 Expressionsanalyse von LRPAP1 im *Xenopus laevis*

4.3.1 Lokale Expression von LRPAP1 in adultem *Xenopus laevis* Gewebe

Aus adultem *Xenopus laevis* Gewebe extrahierte Gesamt RNA diente als Matrize für die Reverse Transkriptase, welche mit Hilfe von Random Hexamer Primern die RNA in cDNA umschrieb. Mittels spezifischer LRPAP1-Primer konnte anschließend die Expression von LRPAP1 in unterschiedlichen Geweben des adulten *Xenopus laevis* in einer semi-quantitativen PCR untersucht werden.

Dabei zeigte sich, dass LRPAP1 ubiquitär exprimiert wird (Abb. 11). Es ließen sich Transkripte in nahezu allen untersuchten Gewebearten, und damit allen drei Keimblättern, nachweisen. Die stärkste Expression fand sich in den Geweben von Niere, Gehirn und Leber. Geringere Expressionslevel ließen sich im Herzgewebe und den Lungen sowie in Muskel-, Hoden- und intestinalem Gewebe nachweisen. Im Muskelgewebe konnte keine Expression von LRPAP1 festgestellt werden. Als Kontrolle der eingesetzten Menge an RNA-Matrize wurde die Expression von Histon H4 bestimmt (Heasman et al., 2000; Sindelka et al., 2006). Die Negativkontrolle bestand aus einer Wasserprobe, die die RNA ersetzte. Sie zeigte, dass die Reagenzien nicht kontaminiert waren, indem sie kein DNA- Produkt lieferte.

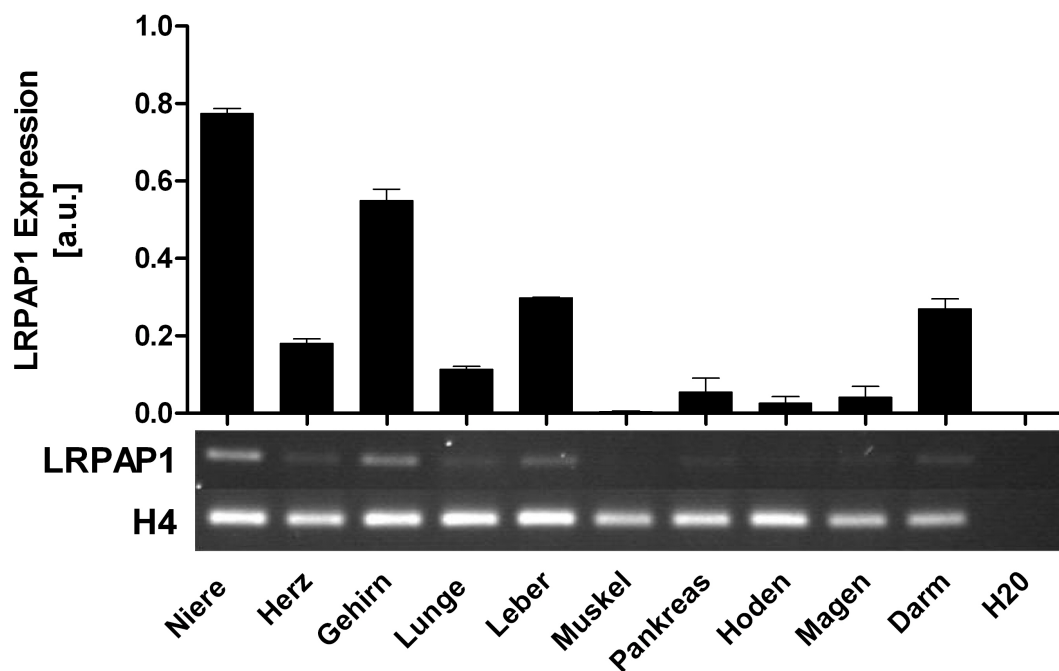


Abb. 11 Expression von LRPAP1 in unterschiedlichen Geweben des adulten *Xenopus laevis*.

Zur Kontrolle der eingesetzten Menge an RNA-Matrize wurde im Zuge der RT-PCR zusätzlich Histon H4 als Kontrolle amplifiziert. (1,-iges Agarosegel; LRPAP1 260 bp). Die Negativkontrolle bestand aus einer Wasserprobe. Zusätzlich dargestellt ist die densitometrische Auswertung der LRPAP1-Expression normiert auf die Histon H4 Kontrolle mit den Mittelwerten \pm Standardfehler (n=2).

4.3.2 Zeitliche Expression von LRPAP1 in unterschiedlichen Embryonalstadien des

Xenopus laevis

Aus einer aufsteigenden Reihe von RNA-Präparationen aus *Xenopus laevis* Embryonalstadien (Nieuwkoop und Faber, 1994) wurde die extrahierte RNA mittels Reverser Transkriptase und unter Verwendung von Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben, um anschließend mittels PCR und spezifischer LRPAP1-Primer die zeitliche Expression von LRPAP1 in der Frühentwicklung von *Xenopus laevis* zu untersuchen.

Dabei konnten LRPAP1-Transkripte bereits im unbefruchteten Ei nachgewiesen werden (Stadium 0, Abb. 12). Diese maternalen Transkripte blieben bis zum Beginn der Gastrulation (Stadium 12) erhalten. Die zygotische Expression wurde mit Beginn der Neurulation im Stadium 15 angeschaltet und stieg dann kontinuierlich bis zum Stadium 40 (schwimmende Kaulquappe), dem letzten untersuchten Stadium in dieser Arbeit, an. Als Ladekontrolle wurde die Expression der Ornithindecaboxylase (ODC) bestimmt (Heasman et al., 2000; Sindelka et al., 2006). Die Kontaminationskontrolle wurde mit Wasser durchgeführt.

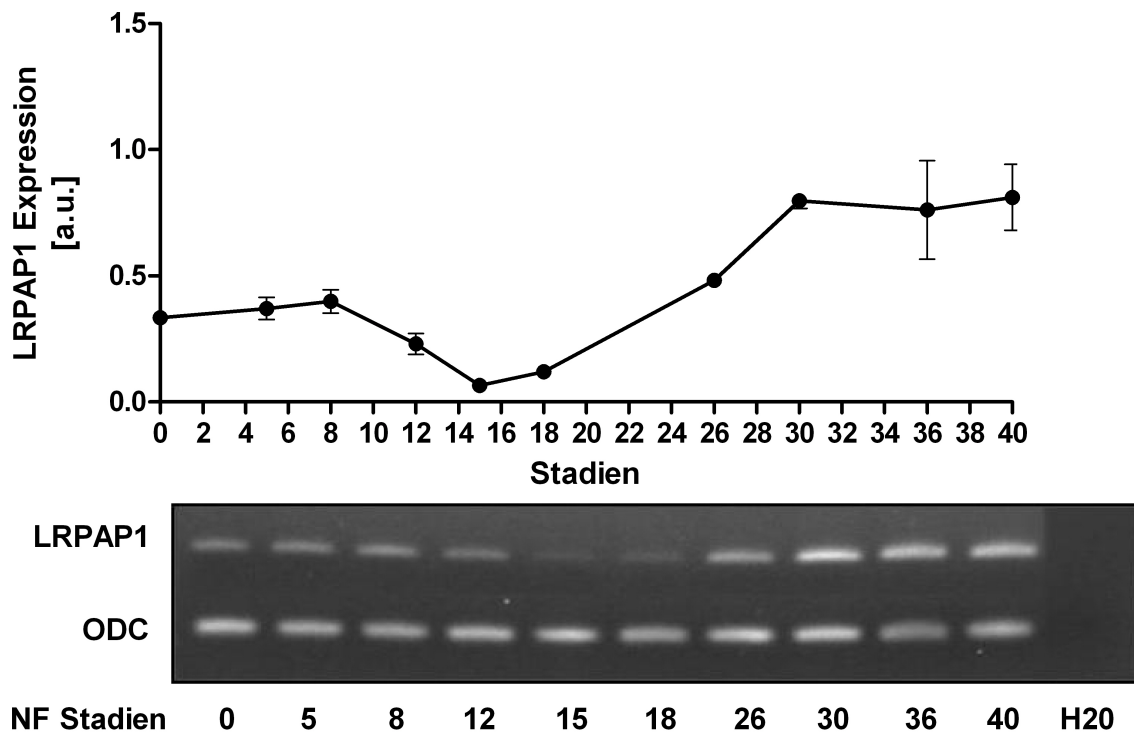


Abb. 12 Zeitliche Expression von LRPAP1 in Embryonalstadien des *Xenopus laevis*

Analyse der zeitlichen Expression von LRPAP1 mittels RT-PCR der RNA-Präparationen der angegebenen Embryonalstadien. Zur Kontrolle und Quantifizierung der LRPAP1-Expression wurde die Expression der Ornithindecaboxylase (ODC) bestimmt. (1%iges Agarosegel, LRPAP1 260 bp). Die Negativkontrolle bestand aus einer Wasserprobe anstelle von RNA. Zusätzlich dargestellt ist die densitometrische Auswertung der LRPAP1-Expression normiert auf die ODC Kontrolle mit den Mittelwerten \pm Standardfehler (n=3). Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994.

4.3.3 Whole mount *in situ* Expressionsanalyse von LRPAP1 in Embryonalstadien des *Xenopus laevis*

Mit Hilfe von whole mount *in situ* Hybridisierungen wurden in unterschiedlichen Stadien fixierte *Xenopus laevis* Embryonen mit einer DIG-markierten LRPAP1-*antisense*-RNA-Sonde hybridisiert. Nach Inkubation der Embryonen mit Anti-DIG-AK und folgender Färbung mit APB und NBT/BCIP konnte die Expression von LRPAP1 *in situ* analysiert werden.

Transkripte von LRPAP1 ließen sich dabei erstmals im Stadium 24 nachweisen (Abb. 13). Ab Stadium 26 war eine deutlichere, räumlich scharf begrenzte Färbung ventrolateral der Somiten am Ende des Nachhirns zu erkennen. Diese Lokalisation lässt vermuten, dass LRPAP1 im Bereich der sich entwickelnden Vorniere exprimiert wird, in welchem die Zellen eine mesenchymale-epitheliale Transition durchlaufen, um die späteren Vornierentubuli zu bilden (Nieuwkoop und Faber, 1994). Die histologische Analyse der späteren Embryonalstadien

unterstützte diese Beobachtung. Dabei stellte sich das Expressionsmuster bis zum Stadium 29 (Abb. 13) in einem gleichmäßig, nahezu ovalen Zellhaufen dar, welcher beidseits im Bereich der Nierenanlage lokalisiert zu sein schien. Lateral grenzte dieser Zellhaufen direkt an die Epidermis. Später, ab Stadium 31 (Abb. 14), erkannte man die Expression von LRPAP1 scharf begrenzt im Randbereich der sich zu einer Art Hohlorgan weiter differenzierenden Vorniere. Im Stadium 40 (Abb. 15), dem letzten untersuchten Stadium in dieser Arbeit, ließ sich weiterhin die Expression im Bereich der zu diesem Zeitpunkt voll funktionstüchtigen Vorniere nachweisen.

Weitere Transkripte, welche in allen untersuchten Entwicklungsstadien (Abb. 13 bis Abb. 15) zu finden waren, ließen sich anhand der Färbungen im Bereich der Augen- und Hirnanlagen und in den Somiten erkennen. Ebenso zeigte sich im Bereich der Ohranlage eine schwache Expression, welche bis Stadium 40 erkennbar war. Die Färbungen im Bereich der Kiemenbögen nahmen von Stadium 24 bis 36 ab und ließen sich ab Stadium 39 nicht mehr eindeutig abgrenzen. Ähnlich verhielt es sich mit den Signalen im Bereich der Augenanlage. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LRPAP1 scharf begrenzt in den Vornierentubuli exprimiert wird und zusätzlich noch in den Hirn- und Augenanlagen sowie in den Somiten und Kiemenbögen nachzuweisen ist.

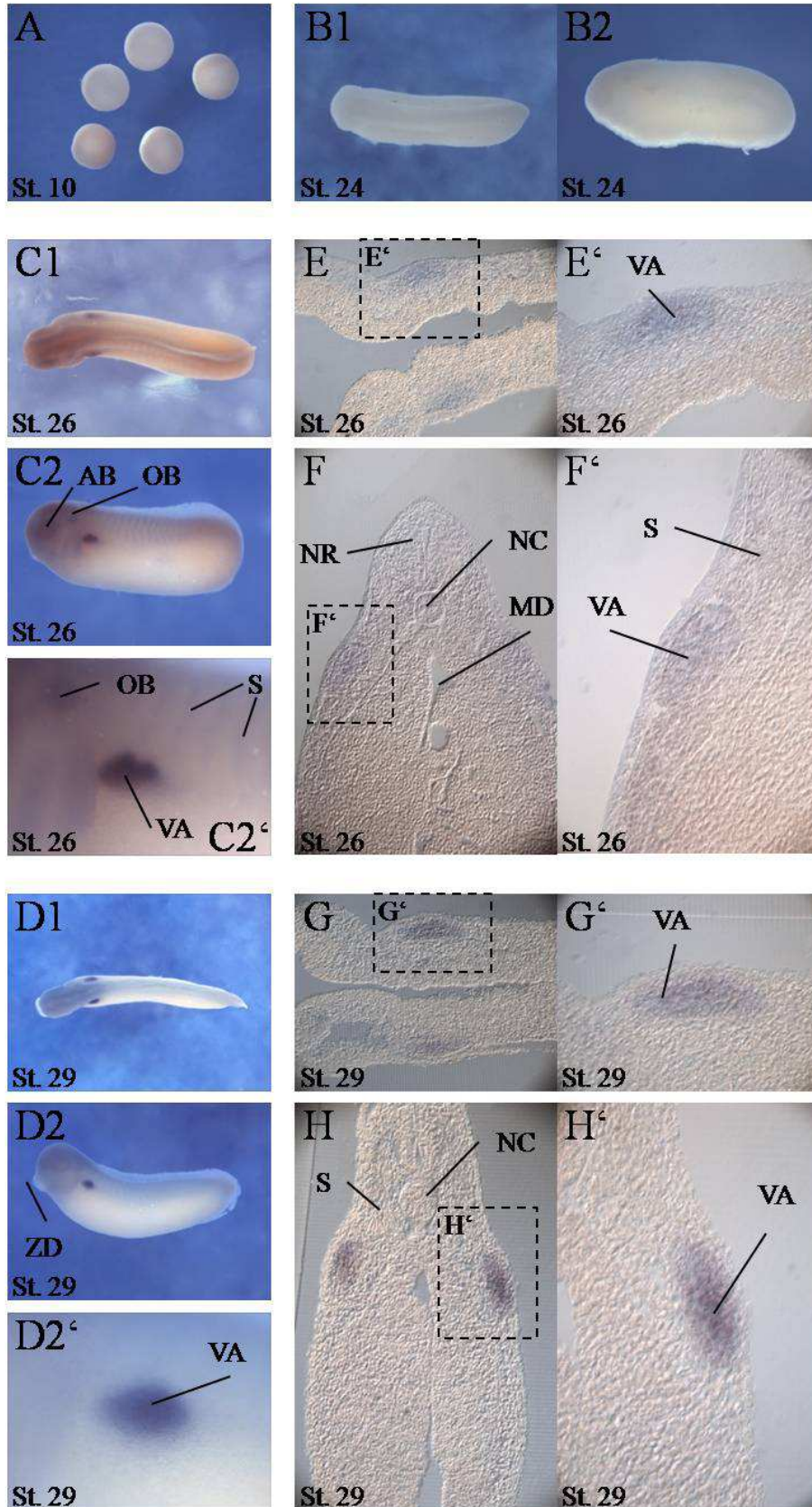


Abb. 13 Expression von LRPAP1, Embryonalstadien 10 bis 29

A bis D Embryonen in situ; 1 dorsale Ansicht, 2 laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung 2^x; E und G horizontale histologische Vibratomschnitte mit jeweiliger Ausschnittsvergrößerung E^x und G^x; F und H transversale histologische Vibratomschnitte mit jeweiliger Ausschnittsvergrößerung F^x und H^x; Abkürzungen: AB, Augenbläschen; MD, Mitteldarm; NC, Notochord; NR, Neuralrohr; OB, Ohrenbläschen; S, Somiten; VA, Vornierenanlage; ZD, Zementdrüse. Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994.

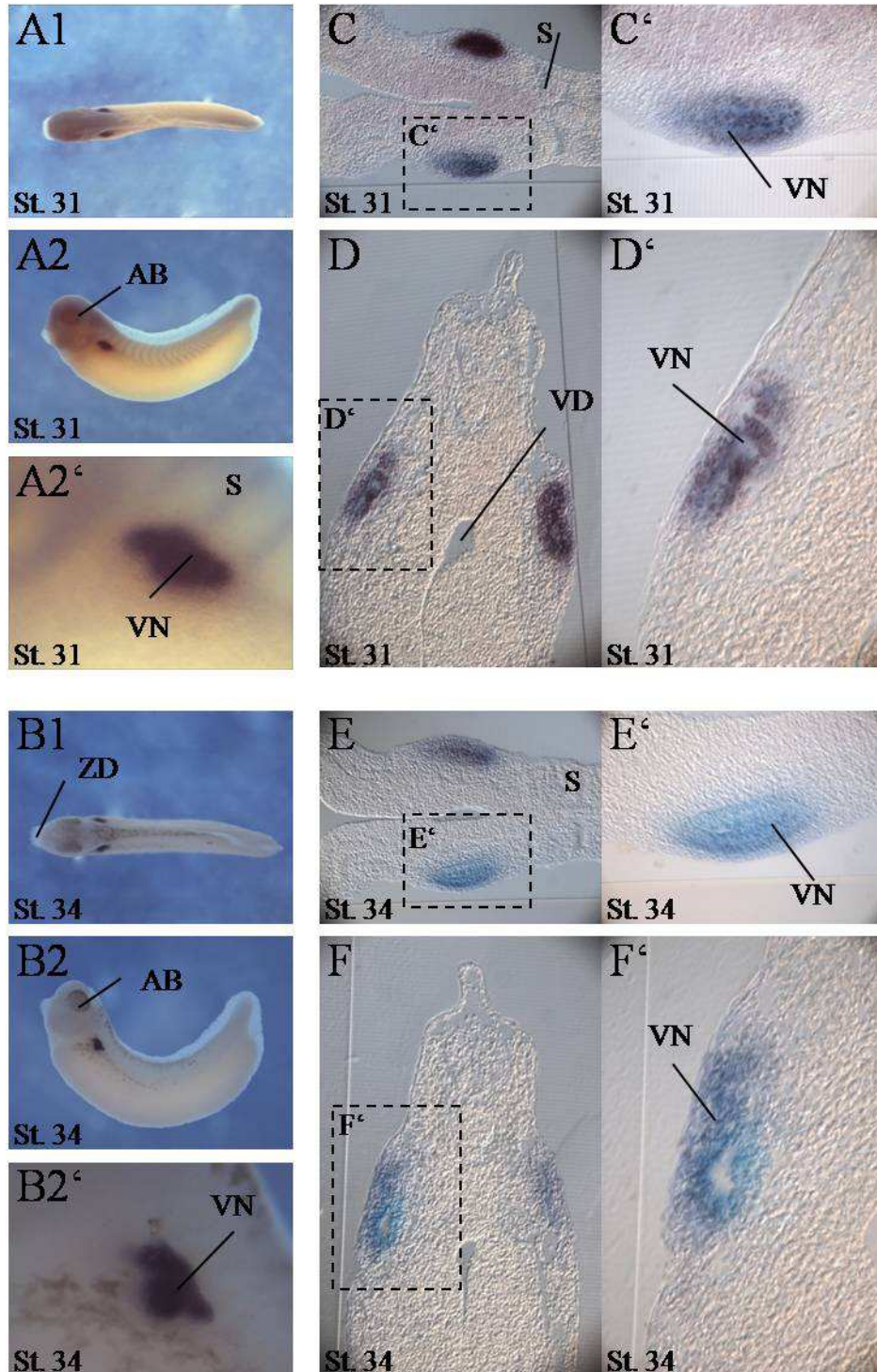


Abb. 14 Expression von LRPAP1, Embryonalstadien 31 und 34

A und B Embryonen in situ; 1 dorsale Ansicht, 2 laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung 2'; C und E horizontale histologische Vibratonschnitte mit jeweiliger Ausschnittsvergrößerung C' und E'; D und F transversale histologische Vibratonschnitte mit jeweiliger Ausschnittsvergrößerung D' und F'. Abkürzungen: AB, Augenbecher; S, Somiten; VD, Vorderdarm; VN, Vorniere; ZD, Zementdrüse. Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994.

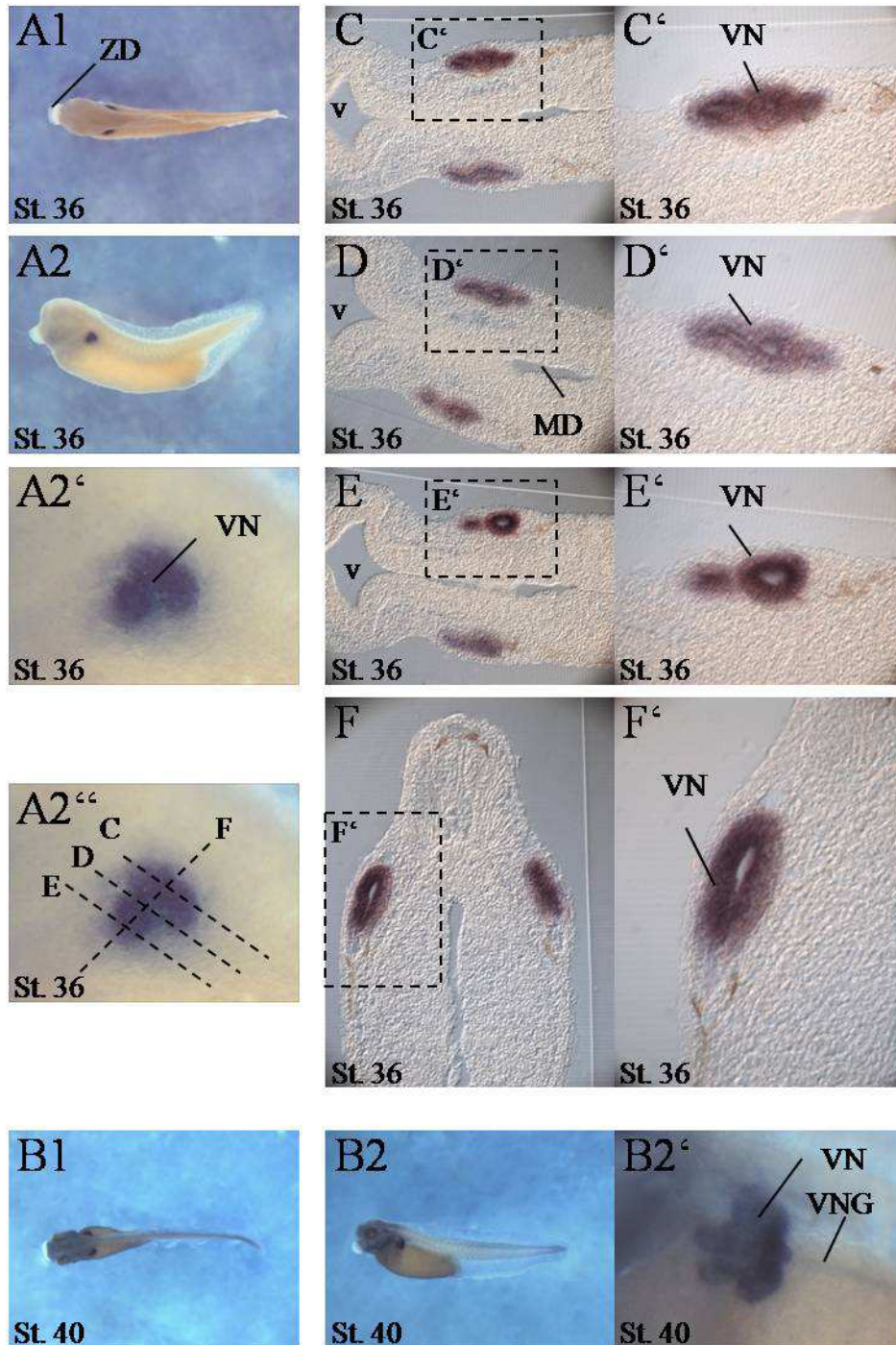


Abb. 15 Expression von LRPAP1, Embryonalstadien 36 und 40

A und B Embryonen in situ; 1 dorsale Ansicht, 2 laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung 2^x und histologischen Schnittrichtungen 2[']; C, D und E horizontale histologische Vibratomschnitte mit jeweiliger Ausschnittsvergrößerung C['], D['] und E[']; F transversaler histologischer Vibratomschnitt mit Ausschnittsvergrößerung F[']. Abkürzungen: MD, Mitteldarm; V, Ventrikel; VN, Vorniere; VNG, Vornierengang; ZD, Zementdrüse. Stadieneinteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994.

4.3.4 Lokalisation von LRPAP1 innerhalb der Vorniere des *Xenopus laevis* mittels

Doppel-WMISH

Zur genaueren Beschreibung der Lokalisation von LRPAP1 innerhalb der Vorniere des *Xenopus laevis* wurden im Stadium 36 fixierte Embryonen zuerst mit bekannten DIG-markierten RNA-Sonden (Reggiani et al., 2007) hybridisiert und im Anschluss mit FastRed-Farbstoff (Roche) rötlich angefärbt (Holleman et al., 1998). Um die einzelnen Segmente der Vorniere zu detektieren, wurden dabei die folgenden *solute carrier (slc)* Gene als Marker genutzt: *slc5a2* (Proximaler Tubulus 1+2), *slc12a1* (Intermediärtubulus 1+2, sowie Distaler Tubulus1) und *Pax2* (alle Abschnitte der Vorniere vom proximalen Tubulus 1 bis zum Verbindungstubulus). Nach mehreren Waschschritten erfolgte dann die zweite Hybridisierung der Embryonen mit Fluorescein-markierten LRPAP1-RNA-Sonden, welche anschließend mit NBT/BCIP bläulich-violett angefärbt wurden.

Wie in Abb. 16 dargestellt ist, ließ sich ein deutliches (bläulich-violettes) Signal in allen drei Abschnitten des proximalen Tubulussystems der embryonalen Vorniere erkennen. Das rötliche Signal, welches die Expression von *slc5a2* darstellt, ließ sich nur in den proximalen Tubulusabschnitten PT1 und PT2 nachweisen. Auch histologisch zeigte sich eindeutig, dass sich die beiden Signale (LRPAP1 und *slc5a2*) in den proximalen Tubulusabschnitten 1 und 2 überlagern und damit LRPAP1 in diesen Abschnitten exprimiert wird. Um zu überprüfen, ob LRPAP1 zusätzlich auch im proximalen Tubulusabschnitt 3 exprimiert wird, erfolgte eine weitere Hybridisierung mit dem Nierensegmentmarker *slc12a1*, welcher im Intermediärtubulus (IT1 und IT2) und im ersten Abschnitt des distalen Tubulus (DT1) exprimiert wird (Abb. 17). Dabei ließ sich eindeutig erkennen, dass sich die beiden Signale (LRPAP1 und *slc12a1*) am Übergang vom proximalen zum Intermediärtubulus nicht überlagern. Das Signal von LRPAP1 erschien im Bereich des proximalen Tubulusabschnitts, das Signal von *slc12a1* in dem sich direkt anschließenden intermediären Tubulusabschnitt.

Auch histologisch war die scharfe Begrenzung der Expression in diesen Abschnitten zu belegen. Um dieses Ergebnis abschließend zu bestätigen, erfolgte eine weitere Hybridisierung mit *Pax2*, einem Nierenmarker, welcher in allen Abschnitten der Vorniere des *Xenopus laevis* exprimiert wird (Abb. 18). Dabei konnte unser Ergebnis bestätigt werden, dass sich beide Signale (LRPAP1 und *Pax2*) ausschließlich im Bereich des proximalen Tubulus überlagern. In den intermediären und distalen Tubulusabschnitten, sowie im Verbindungstubulus ließ sich nur das rötliche Signal der Expression von *Pax2* erkennen.

Damit kann zusammenfassend gesagt werden, dass LRPAP1 im *Xenopus laevis* in allen drei Abschnitten der proximalen Vornierentubuli exprimiert wird.

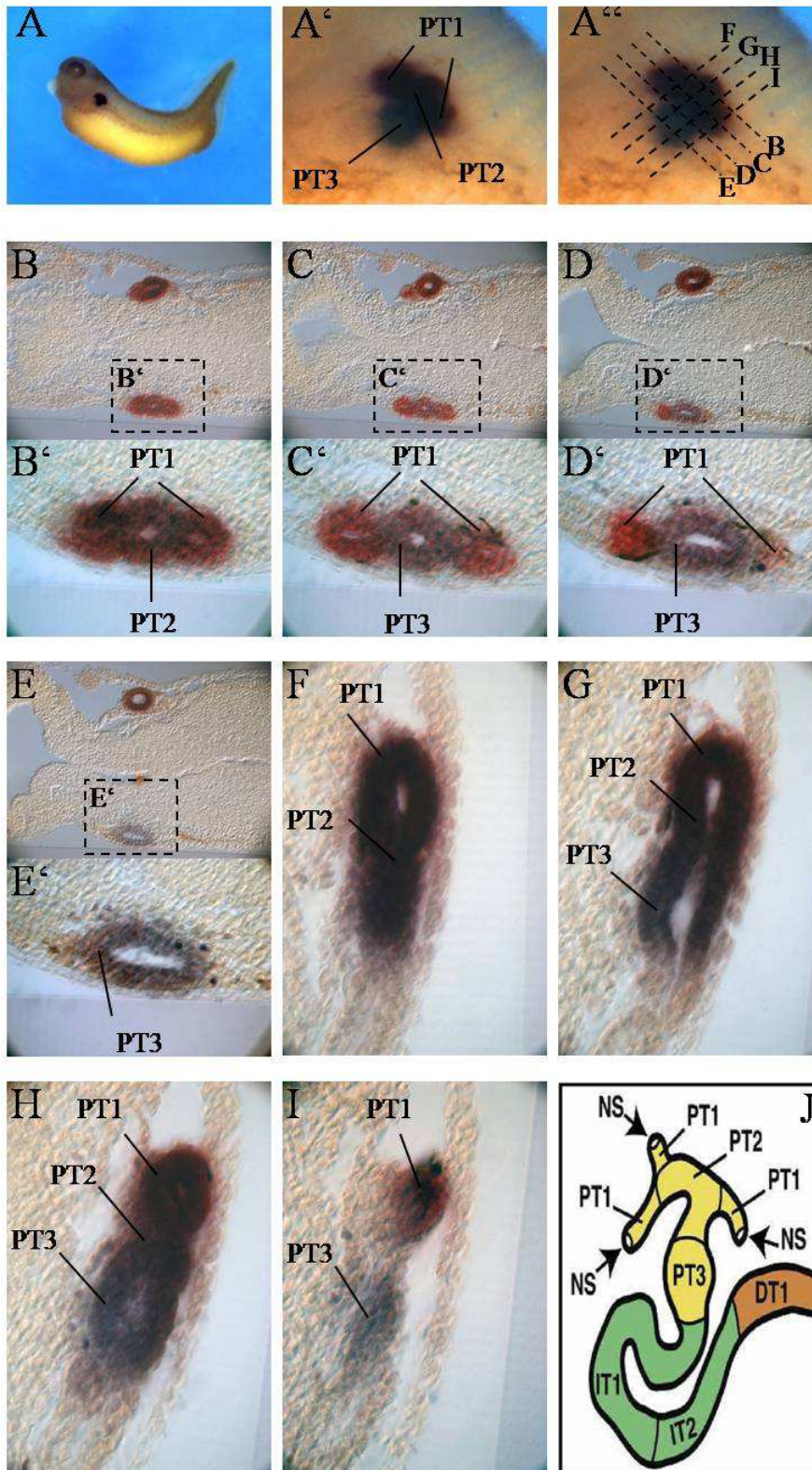


Abb. 16 WISH mit Doppelfärbung von LRPAP1 mit dem Marker *slc5a2*

Die bläulich-violette Färbung entspricht LRPAP1, die rote Färbung dem Marker *slc5a2*, welcher im proximalen Tubulus PT1 und PT2 exprimiert wird. Eine Überlagerung beider Signale lässt sich ausschließlich in den proximalen Tubulusabschnitten PT1 und PT2 nachweisen. LRPAP1 ist zusätzlich auch im proximalen Tubulusabschnitt PT3 exprimiert. A, laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung A' und histologischen Schnittrichtungen A''; B, C, D und E horizontale histologische Vibratomschnitte mit jeweiliger Ausschnittsvergrößerung B', C', D' und E'; F, G, H und I transversale histologische Vibratomschnitte; J Schemazeichnung (Grafik modifiziert nach Raciti et al. (2008)); Weitere Abkürzungen: NS, Nephrostom; IT, Intermediärtubulus; DT, distaler Tubulus; Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994.

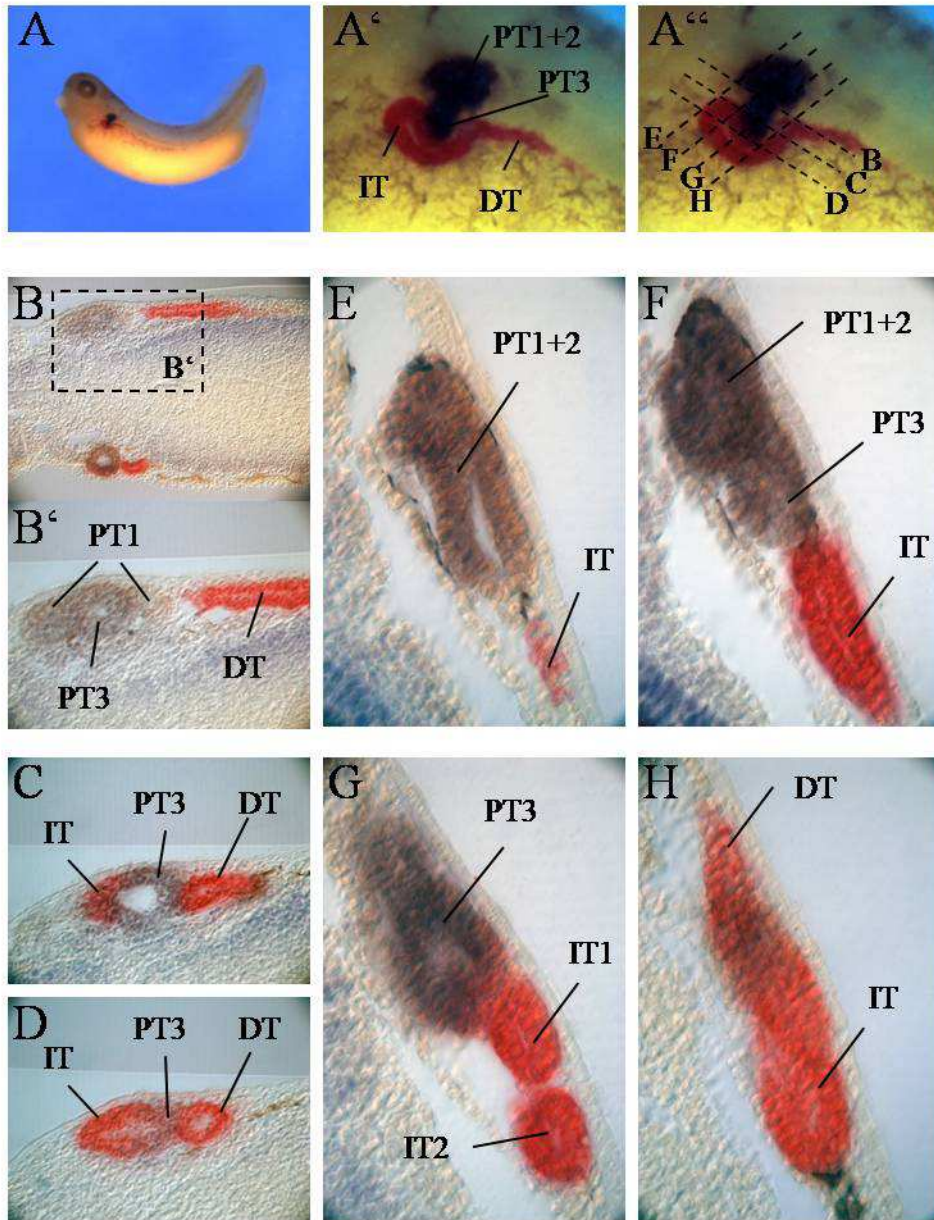


Abb. 17 WISH mit Doppelfärbung von LRPAP1 mit dem Marker *slc12a1*

Die bläulich-violette Färbung entspricht LRPAP1, die rote Färbung dem Marker *slc12a1*, welcher im intermediären Tubulus 1 und 2 (IT1, IT2), sowie im distalen Tubulusabschnitt 1 (Boucher et al., 2003) exprimiert wird. Es besteht keine Überlagerung der beiden Signale am Übergang vom proximalen zum Intermediärtubulus. Auch histologisch lässt sich die scharfe Begrenzung der Expression in diesen Abschnitten feststellen. A, laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung A' und histologischen Schnittrichtungen A''; B, C und D horizontale histologische Vibratomschnitte A mit Ausschnittsvergrößerung B'; E, F, G und H transversale histologische Vibratomschnitte; Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994. Weitere Abkürzungen: DT, distaler Tubulus ; PT, proximaler Tubulus.

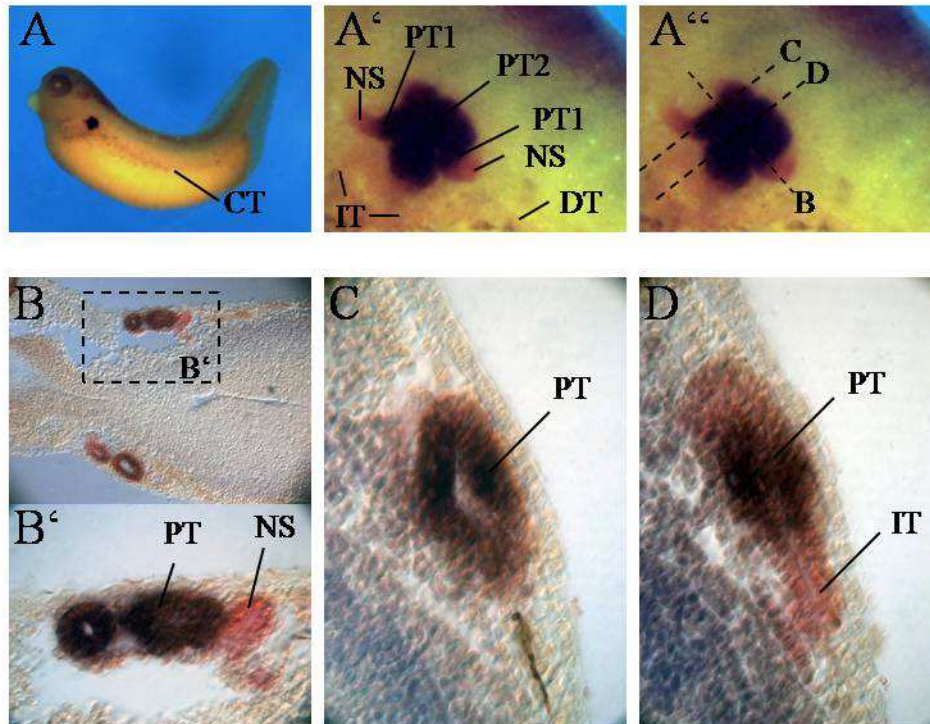


Abb. 18 WMISH mit Doppelfärbung von LRPAP1 mit dem Marker *Pax2*

Die bläuliche Färbung entspricht LRPAP1, die rote Färbung dem Marker *Pax2*, welcher in der kompletten Vorniere exprimiert wird. Es lässt sich ausschließlich im proximalen Tubulus (PT) eine Überlagerung beider Signale erkennen. A, laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung A' und histologischen Schnittrichtungen A''; B horizontaler histologischer Vibratomschnitt mit Ausschnittsvergrößerung B'; C und D transversale histologische Vibratomschnitte; Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994. Weitere Abkürzungen: CT, Verbindungstubulus (*connecting tube*); DT, distaler Tubulus; IT, Intermediärtubulus; NS, Nephrostom.

4.4 Loss-of-function Analyse von *Xenopus laevis* LRPAP1

Im Rahmen einer *loss-of-function*-Analyse wurden spezifische LRPAP1 *antisense* Morpholino-Oligonukleotide (LRPAP1-Morpholino) im Zweizellstadium heranwachsender *Xenopus laevis* Embryonen injiziert, um die Translation des entsprechenden Transkripts zu blockieren. Zur späteren Kontrolle der erfolgreichen Injektion wurde dabei β -Galaktosidase-mRNA (β -Gal) ko-injiziert. Dann wurden die Embryonen in 0,1 x MBS bis zum Stadium 36 kultiviert. Anschließend erfolgte die Fixierung in MEMFA und eine Färbung mit X-Gal, wodurch sich die injizierte Seite des Embryos von der nicht injizierten Seite unterscheiden ließ. Die Ergebnisse der injizierten Seite konnten somit direkt mit der nicht injizierten Seite verglichen werden. Anschließend wurden die fixierten Embryonen mittels WMISH mit DIG-markierten (Nierenmarker-) RNA-Sonden (Reggiani et al., 2007) hybridisiert. Um auch hier die einzelnen Segmente der Vorniere zu detektieren, wurden dabei wieder die Marker *slc5a2* (Proximaler Tubulus PT1 und PT2), *slc7a13* (Proximaler Tubulus PT3), *slc12a1* (Intermediärtubulus IT1 und IT2 sowie Distaler Tubulus DT1) und *Pax2* (alle Abschnitte der Vorniere vom proximalen Tubulus PT1 bis zum Verbindungstubulus) verwendet.

Der LRPAP1-Morpholino bindet spezifisch im Bereich der letzten vier Nukleotide der 5'-UTR und der ersten 21 Nukleotide des ORF der LRPAP1 Sequenz (siehe Abb. 19).

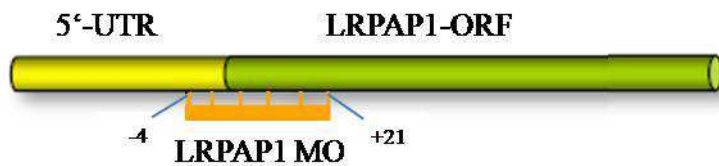


Abb. 19 Schematische Darstellung des Bindungsbereichs des LRPAP1 Morpholinos.
 Grafik modifiziert nach (Wu, 2008).

Die Morpholino-Aktivität wurde in einem *in vitro* Translations- und Transkriptionstest (TnT-Test) überprüft. Dafür verwendeten wir das TnT[®] Quick Coupled Transkription/Translation System (Promega) nach Herstellerangaben. Es wurden zu der LRPAP1-Plasmid-DNA die beiden Morpholinokonzentrationen (1,6 pmol und 2,5 pmol) eingesetzt, welche bei den Injektionen Verwendung fanden. Als Positivkontrolle diente Luciferase-Plasmid-DNA, als Negativkontrolle ausschließlich Wasser, um Verunreinigungen auszuschließen. Wie in Abb. 20 zu sehen ist hemmt der LRPAP1 Morpholino in beiden Konzentrationen die Translation von LRPAP1 vollständig. Es ließ sich kein LRPAP1-Produkt nachweisen. Die Translation von Luciferase blieb hingegen ungestört und lieferte ein circa 60 kDa großes Protein.

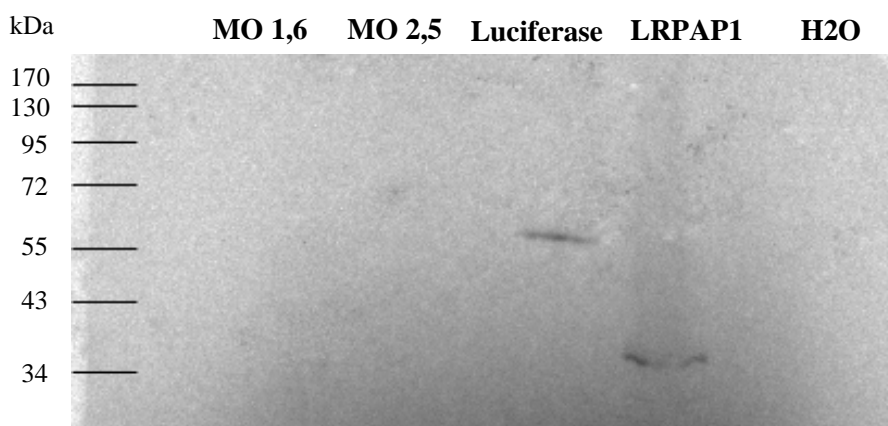


Abb. 20 In vitro Translations-und-Transkriptions-Test zur Kontrolle der Morpholino-Funktion
 Sowohl der LRPAP1 Morpholino in der Konzentration 1,6 pmol (MO 1,6), als auch der in der Konzentration 2,5 pmol (MO 2,5) inhibieren die Translation von LRPAP1. Die Größen von LRPAP1 (39 kDa), welches als Größenkontrolle auf das Gel aufgetragen wurde, und dem Enzym Luciferase (60 kDa), welches als Positivkontrolle diente, entsprechen denen der Literatur- bzw. Herstellerangaben. Zur Negativkontrolle wurde ausschließlich H2O eingesetzt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Der LRPAP1-Morpholino wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 pmol/Zelle und 1,6 pmol/Zelle) injiziert. Es konnten dabei keine Unterschiede im Phänotyp der im Stadium 36 fixierten *Xenopus laevis* Embryonen festgestellt werden. Es zeigten sich außerdem zwischen beiden Konzentrationen nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Mortalität, was in Abb. 21 und Tabelle 4 dargestellt ist. Im Stadium 36 waren nach Injektion von 2,5 pmol/Zelle noch 58,1% und nach Injektion von 1,6 pmol/Zelle noch 60,7% der Embryonen am Leben. Zur Kontrolle wurden 2,5 pmol eines Standard-Morpholinos pro Zelle injiziert und dabei eine Überlebensrate von 65,9% ermittelt.

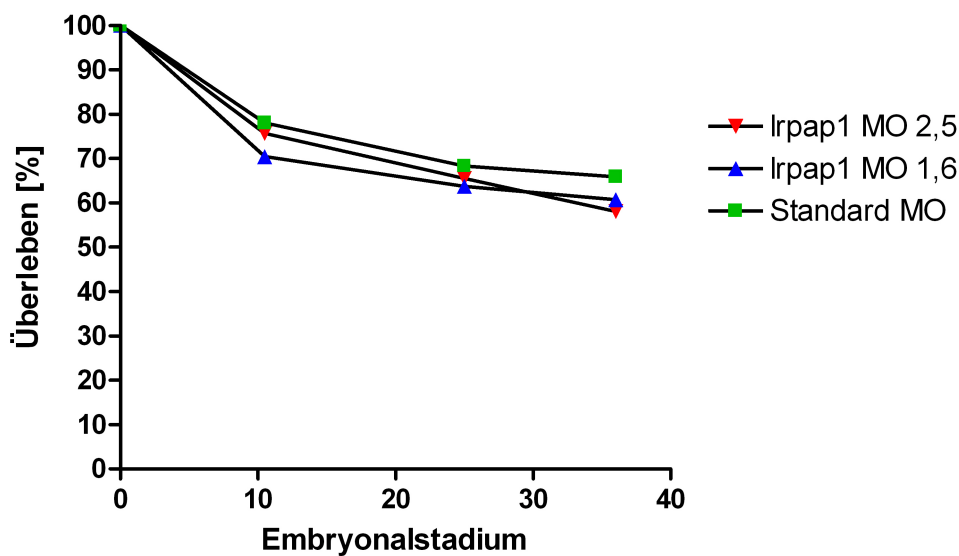


Abb. 21 Überleben der *Xenopus laevis* Embryonen nach Morpholino-Injektion

Dargestellt ist die Überlebensrate der in den Stadien 0; 10,5; 25 und 36 gezählten Embryonen nach Injektion der LRPAP1-Morpholinos in den beiden Konzentrationen 2,5 pmol/Zelle und 1,6 pmol/Zelle. Zur Kontrolle diente die Anzahl der überlebten Embryonen nach Injektion von 2,5 pmol eines Standard-Morpholinos pro Zelle. Für die genauen Werte siehe Tabelle 4, Einteilung der Stadien nach Nieuwkoop und Faber, 1994.

Tabelle 4 Überleben der *Xenopus laevis* Embryonen nach Morpholino-Injektion

	<i>Stadium 0</i>	<i>Stadium 10,5</i>	<i>Stadium 25</i>	<i>Stadium 36</i>
lrpap1 MO 2,5	100% (n=148)	75,7% (n=112)	65,5% (n=97)	58,1% (n=86)
lrpap1 MO 1,6	100% (n=135)	70,4% (n=95)	63,7% (n=86)	60,7% (n=82)
Standard MO	100% (n=41)	78% (n=32)	68,3% (n=28)	65,9% (n=27)

Wie in Abb. 22 dargestellt ist, ließ sich sowohl auf der injizierten als auch auf der nicht injizierten Seite des *Xenopus laevis* Embryos ein deutliches Signal von *slc5a2* im Bereich des proximalen Tubulus der sich entwickelnden Vorniere erkennen. Dabei ließen sich auf beiden Seiten sowohl der proximale Tubulus PT1 als auch PT2 ohne morphologische Unterschiede nachweisen.

Ebenso verhielt es sich mit dem Signal von *slc7a13* (Abb. 23). Auf beiden Seiten des Embryos ließ sich ein schwaches, aber histologisch eindeutiges Signal im Bereich des proximalen Tubulusabschnitts PT3 erkennen. Strukturelle Unterschiede waren auch hier nicht sichtbar. Um zu überprüfen, ob der *Gen-knockdown* von LRPAP1 Effekte auf andere Tubulusabschnitte der Vorniere des *Xenopus laevis* hat, wurden auch noch die weiteren Nierenabschnitte auf Anomalien untersucht (siehe Abb. 24 und Abb. 25). Doch auch hier ließen sich keine Unterschiede zwischen injizierter und nicht injizierter Seite nachweisen. Sowohl die Expression von *slc12a1* in den Segmenten IT1, IT2 und DT1, als auch die von *Pax2* in der gesamten Vorniere, wiesen keine morphologischen Unterschiede auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es nach dem *LRPAP1-knockdown* in heranwachsenden *Xenopus laevis* Embryonen zu keinen morphologischen Veränderungen der embryonalen Vorniere kommt. Es zeigten sich keine weiteren Anomalien der Embryonen und es konnte auch keine wesentlich höhere Mortalitätsrate der injizierten Embryonen festgestellt werden.

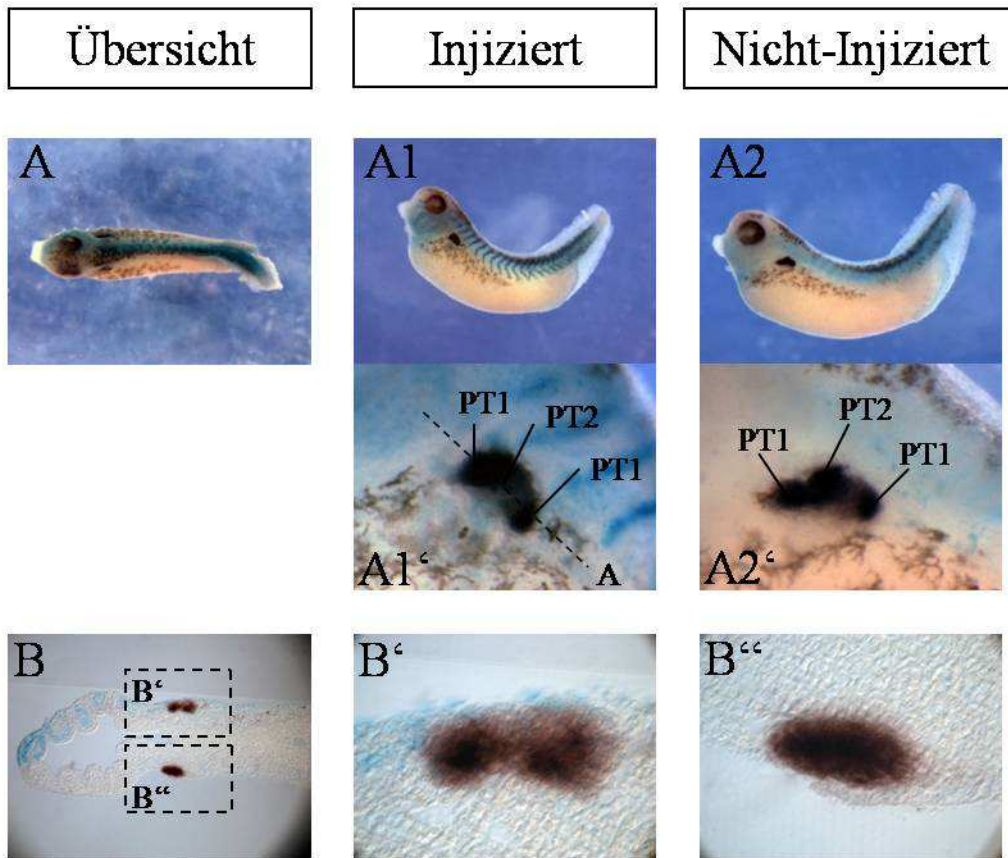


Abb. 22 LRPAP1-Knock-down durch MO-Injektion mit anschließender WMISH, Marker *slc5a2*

2,5 pmol von LRPAP1-Morpholino wurden im Zweizellstadium heranwachsender *Xenopus laevis* Embryonen zusammen mit β -Gal injiziert. Nach Kultivierung in 0,1 x MBS wurden die Embryonen in MEMFA fixiert und mit x-Gal zur Injektionskontrolle gefärbt. Durch die einseitige Blaufärbung ist die injizierte Seite des Embryos zu erkennen. Anschließend erfolgte eine WMISH mit DIG-markierter *slc5a2*-RNA-Sonde. Es lassen sich auf beiden Seiten die proximalen Tubulusabschnitte PT1 und PT2 ohne strukturelle Unterschiede erkennen.

A, *In situ* Embryo dorsale Ansicht mit lateralen Ansichten 1 und 2 und jeweiliger Ausschnittsvergrößerung 1' und 2'; B, horizontaler histologischer Vibratonschnitt mit Ausschnittsvergrößerung B' und B''; Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994.

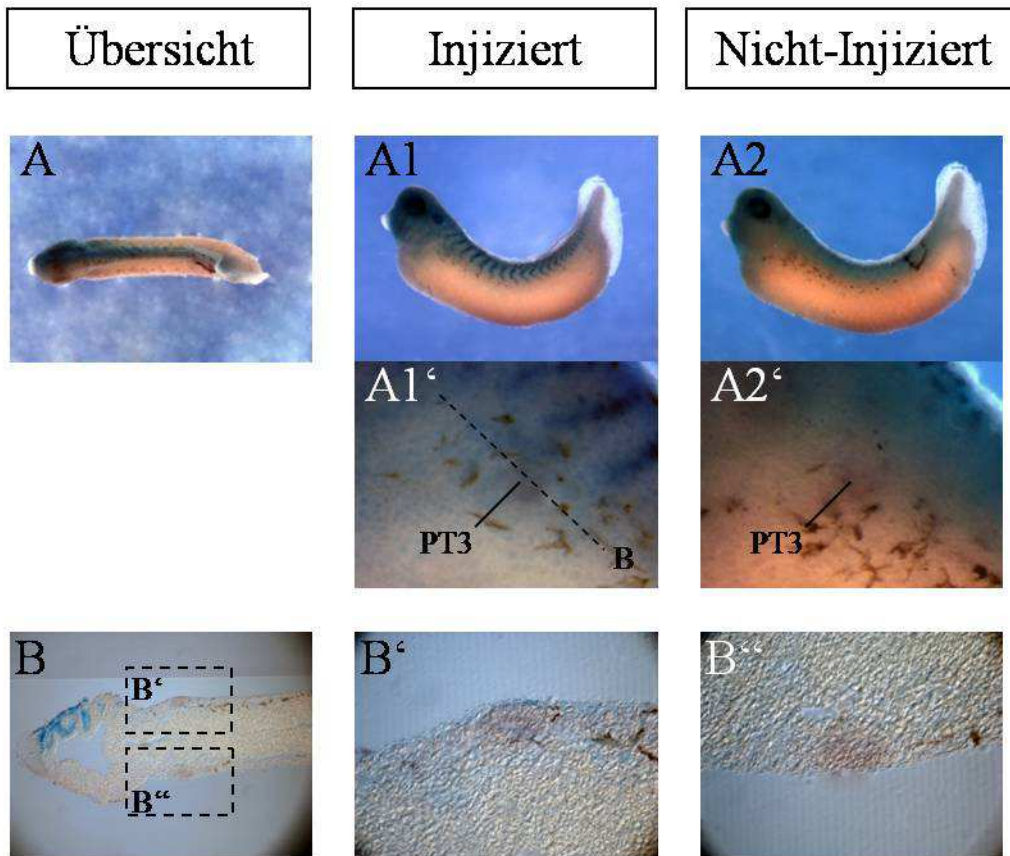


Abb. 23 LRPAP1-Knock-down durch MO-Injektion mit anschließender WMISH, Marker *slc7a13*

2,5 pmol von LRPAP1-Morpholino wurden im Zweizellstadium heranwachsender *Xenopus laevis* Embryonen zusammen mit β -Gal injiziert. Nach Kultivierung in 0,1 x MBS wurden die Embryonen in MEMFA fixiert und mit x-Gal zur Injektionskontrolle gefärbt. Durch die einseitige Blaufärbung ist die injizierte Seite des Embryos zu erkennen. Anschließend erfolgte eine WMISH mit DIG-markierter *slc7a13*-RNA-Sonde. Es lässt sich auf beiden Seiten der proximale Tubulus PT3 ohne strukturelle Unterschiede erkennen.

A, *In situ* Embryo dorsale Ansicht mit lateralen Ansichten 1 und 2 und jeweiliger Ausschnittsvergrößerung 1' und 2'; B, horizontaler histologischer Vibratomschnitt mit Ausschnittsvergrößerung B' und B''; Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994.

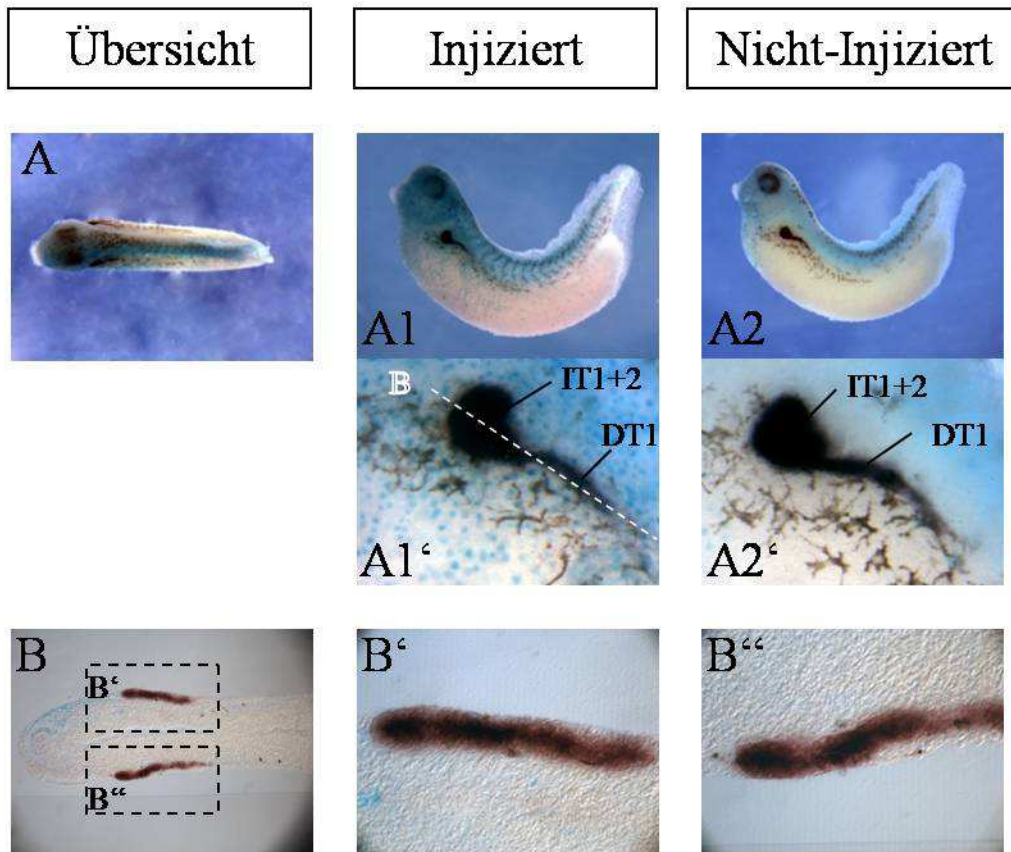


Abb. 24 LRPAP1-Knock-down durch MO-Injektion mit anschließender WMISH, Marker *slc12a1*

2,5 pmol von LRPAP1-Morpholino wurden im Zweizellstadium heranwachsender *Xenopus laevis* Embryonen zusammen mit β -Gal injiziert. Nach Kultivierung in 0,1 x MBS wurden die Embryonen in MEMFA fixiert und mit x-Gal zur Injektionskontrolle gefärbt. Durch die einseitige Blaufärbung ist die injizierte Seite des Embryos zu erkennen. Anschließend erfolgte eine WMISH mit DIG-markierter *slc12a1*-RNA-Sonde. Es lassen sich auf beiden Seiten die intermediären Tubulusabschnitte IT1 und IT2, sowie der distale Tubulusabschnitt DT1 ohne strukturelle Unterschiede erkennen.

A, *In situ* Embryo dorsale Ansicht mit lateralen Ansichten 1 und 2 und jeweiliger Ausschnittsvergrößerung 1' und 2'; B, horizontaler histologischer Vibratonschnitt mit Ausschnittsvergrößerung B' und B''; Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994.

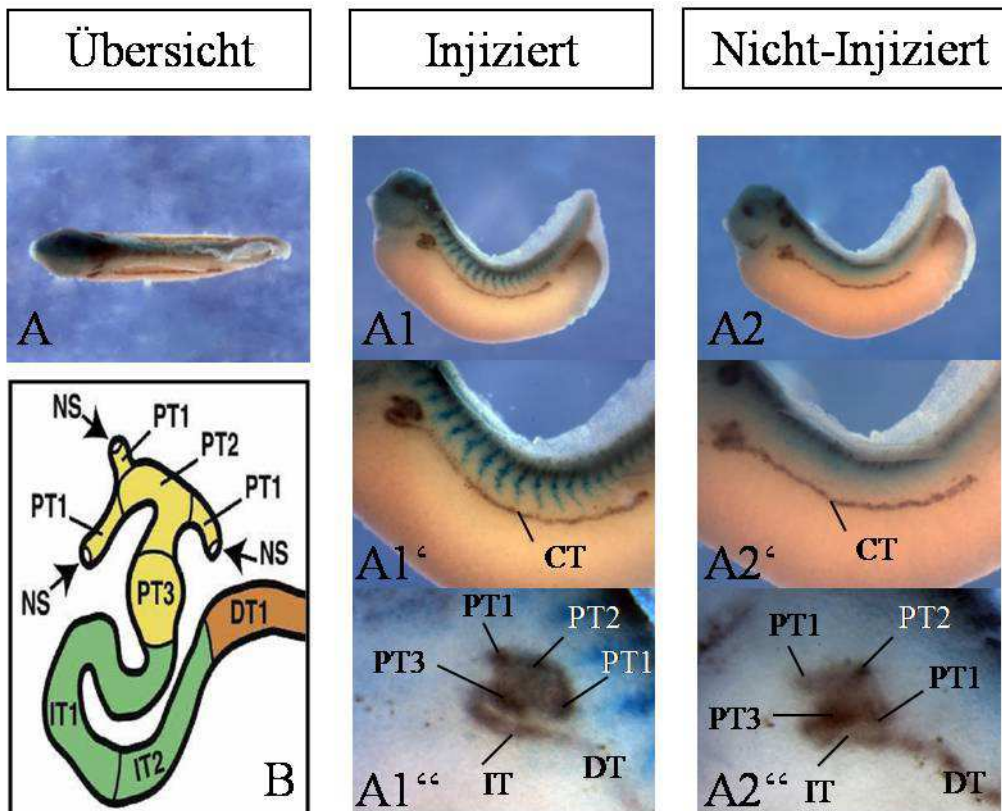


Abb. 25 LRPAP1-Knock-down durch MO-Injektion mit anschließender WMISH, Marker Pax2

2,5 pmol von LRPAP1-Morpholino wurden im Zweizellstadium heranwachsender *Xenopus laevis* Embryonen zusammen mit β -Gal injiziert. Nach Kultivierung in 0,1 x MBS wurden die Embryonen in MEMFA fixiert und mit x-Gal zur Injektionskontrolle gefärbt. Durch die einseitige Blaufärbung ist die injizierte Seite des Embryos zu erkennen. Anschließend erfolgte eine WMISH mit DIG-markierter *Pax2*-RNA-Sonde. Es lassen sich auf beiden Seiten alle Abschnitte der Vorniere des *Xenopus laevis* ohne strukturelle Unterschiede nachweisen. Die Signalunterbrechung zwischen dem Verbindungstubulus und dem Bereich der Kloake ist durch die noch stattgefundene Fusion beider Abschnitte bedingt.

A, *In situ* Embryo dorsale Ansicht mit lateralen Ansichten 1 und 2 und jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen 1' und 1'' sowie 2' und 2''; B, Schemazeichnung (Grafik modifiziert nach Raciti et al. (2008)); Abkürzungen: NS, Nephrostom; PT, proximaler Tubulus; IT, Intermediärtubulus; DT, distaler Tubulus; CT, Verbindungstubulus (*connecting tubule*); Stadium 36 nach Nieuwkoop und Faber, 1994.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die embryonale Expression von LRPAP1 während der Frühentwicklung des *Xenopus laevis* zu beschreiben. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob LRPAP1 eine essentielle Rolle in der Frühentwicklung der Vorniere spielt. In mRNA-Expressions-Studien konnte gezeigt werden, dass LRPAP1 im *Xenopus laevis* in den Geweben aller drei Keimblätter exprimiert wird, vor allem in der Niere, dem Gehirn und der Leber. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass LRPAP1-Transkripte bereits im unbefruchteten Ei nachzuweisen sind. Diese maternalen Transkripte ließen sich bis zum Beginn der Gastrulation nachweisen. Erst ab dem Embryonalstadium 15 wurden wieder vermehrt LRPAP1-Transkripte gebildet. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* Hybridisierungen belegen eine scharf begrenzte Expression von LRPAP1 innerhalb der Vorniere des heranwachsenden *Xenopus laevis* Embryos. Mit Hilfe von speziellen Nierensegmentmarkern (siehe Kap. 1.8), welche von Reggiani et al. 2007 und Raciti et al. 2008 im Rahmen einer umfangreichen Genexpressionsanalyse von Transportproteinen (sogenannte *solute carrier*; slc) bestimmt wurden, konnte die Expression von LRPAP1 in allen drei proximalen Vornierensegmenten spezifiziert werden. In einer *loss-of-function* Untersuchung wurde durch die Injektion von speziellen *antisense* LRPAP1-Oligonukleotiden (sogenannte Morpholinos) die Proteinbiosynthese gehemmt. Dabei zeigten sich im Vergleich zu den Wildtypen weder Unterschiede in der Morphologie der Vorniere noch im Überleben der Embryonen. Daraus ist zu schließen, dass LRPAP1 keinen Einfluss auf die morphologische Frühentwicklung der Vorniere im *Xenopus laevis* hat.

5.1 Aminosäuresequenzvergleich und phylogenetische Untersuchung

Der im Rahmen der phylogenetischen Untersuchung durchgeführte Aminosäure-Sequenzvergleich von LRPAP1 verschiedener Spezies (Abb. 8) zeigt die mit über 90%iger Sequenzidentität sehr hohe Konservierung der beiden *Xenopus* Proteine (*Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*). Aber auch die übrigen Sequenzen sind, mit Ausnahme der Evertebraten *Anopheles gambiae* (31,9%), *Drosophila melanogaster* (30,6%) und *Caenorhabditis elegans* (24,2%), hoch konserviert. Interessanterweise ist, wieder mit Ausnahme der drei oben genannten Spezies, auch das am Ende der C-terminalen Domäne gefundene HNEL-Motiv bei allen Spezies konserviert. Dieses Motiv ist ein Analogon zum KDEL-Motiv, das bei vielen Proteinen zu finden ist, die sich dauerhaft im ER aufhalten. Durch dieses ER-Retentionssignal werden die Proteine vor deren Sekretion geschützt (Munro und Pelham, 1987; Pelham, 1990). Wie bereits beschrieben wurde, ist LRPAP1 ebenfalls im ER lokalisiert (Bu et al., 1994;

Mokuno et al., 1994; Orlando et al., 1992). Auch die N- und C-terminale Domänenstruktur scheint mit geringfügigen Unterschieden bei allen untersuchten Spezies hoch konserviert zu sein. Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 9) zeigt zudem, dass sich die Sequenzen der Wirbeltiere klar von denen der Nicht-Wirbeltiere abgrenzen lassen. Man erkennt dabei, dass LRPAP1 innerhalb der Primaten (*Homo sapiens*, *Pongo abelii*, *Pan troglodytes* und *Macaca mulatta*), der Paarhufer (*Sus scrofa* und *Bos taurus*), der Nagetiere (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*) oder eben der Froschlurche (*Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*) eigene phylogenetische Gruppen bildet. Die Aminosäuresequenzen von *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* sind allerdings evolutionär sehr weit von den übrigen Spezies entfernt und zeigen damit nur untereinander ein engeres Verwandtschaftsverhältnis. Darüber hinaus zeigt auch die Syntenieanalyse (Abb. 10) das die Genloci von LRPAP1 und deren Nachbargene zwischen *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris*, *Gallus gallus* und *Xenopus tropicalis* hoch konserviert sind. Es lässt sich somit vermuten, dass man auf Grund der engen verwandtschaftlichen Beziehungen von LRPAP1 funktionelle Aspekte des Proteins innerhalb der Gruppe der Wirbeltiere übertragen kann und alle konservierten Proteine die gleiche Funktion haben.

5.2 Expressionsanalyse von LRPAP1

In mRNA-Expressionsanalysen (Abb. 12) konnte festgestellt werden, dass bereits im unbefruchteten *Xenopus laevis* Ei maternale LRPAP1-Transkripte vorhanden sind. Es ist daher anzunehmen, dass LRPAP1 von Beginn der Entwicklung an benötigt wird. Dies vor allem vor dem Hintergrund, dass das Protein als Adapterprotein einer Vielzahl von Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie fungiert (Krieger und Herz, 1994; Strickland et al., 2002) und damit auch an einer Vielzahl an Stoffwechselwegen und physiologischen Prozessen beteiligt ist. So ist zum Beispiel die Biosynthese von Membranen eine der Grundlagen für die Entwicklung von Organismen. Dabei spielt Cholesterol als wichtiger Bestandteil aller Zellmembranen eine entscheidende Rolle. Der LDL-Rezeptor wiederum ist ein Schlüsselbestandteil der Regulierung der Cholesterol-Homöostase und agiert dabei als Schnittstelle zwischen intra- und extrazellulären Cholesterol-Pools, um die Zellen vor einer Überanreicherung zu schützen (Goldstein et al., 1985). LRPAP1 könnte hier als Adapterprotein schon früh in der Entwicklung des *Xenopus* beteiligt sein. Das ebenfalls aus der Familie der LDL-Rezeptoren stammende LRP6 wird während der Gastrulation für das gerichtete Längenwachstum des *Xenopus* Embryos benötigt (Tahinci et al., 2007). Dieses Wachstum hat konvergente Bewegungen des Mesoderms und Neuroektoderms zur Ursache

und wird im *Xenopus*, im Zebrafisch und in der Maus durch den Wnt/PCP (*planar cell polarity*; planare Zellpolarität) Signalweg kontrolliert (Jones und Chen, 2007). Im *Xenopus* Embryo beeinflusst der Wnt/PCP Signalweg die Zellmorphologie und Zellbewegung vor allem durch Veränderungen des Zytoskeletts. LRP6 spielt dabei als Aktivator des Wnt/ β -Catenin Signalweges (Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005) sowie als Inhibitor des Wnt/PCP Signalweges (Tahinci et al., 2007) eine entscheidende Rolle. Auch hier könnte LRPAP1 als Adapterprotein von LRP6 agieren.

Die maternalen LRPAP1 Transkripte lassen sich in unseren Untersuchungen bis zum NF Stadium 12 (Einteilung nach Nieuwkoop und Faber [NF], 1994) nachweisen. Ab NF Stadium 15 ist eine Aktivierung und stetige Zunahme der Expression zu beobachten, was zeitlich der Neurulation des *Xenopus* entspricht. Dies lässt vermuten, dass LRPAP1 auch in diesem Stadium der Entwicklung eine Rolle in den zellulären Prozessen spielt. Als Adapterprotein von Megalin könnte LRPAP1 an der Bildung von Hirnstrukturen beteiligt sein. Studien an Mäusen mit Megalinverlust zeigten ein stark verkleinertes Telencephalon, Holoprosencephalie und einen Verlust der Expression von Sonic Hedgehog (Spoelgen et al., 2005; Willnow et al., 1996a). Ein Grund dafür könnte die verminderte Aufnahme von Nährstoffen, vor allem von cholesterolreichen Lipoproteinen, sein (Fisher und Howie, 2006), da Megalin für deren Endozytose von Bedeutung ist. Interessanterweise zeigen angeborene Fehler der Cholesterolbiosynthese und Mutationen, die den Hedgehog-Signalweg betreffen, den gleichen Holoprosenzephalie-Phänotyp wie Mäuse mit Megalinverlust. Zudem ist die Modifizierung des Hedgehog-Proteins durch Cholesterol sowohl für das Senden und Empfangen des Signals als auch für die gerichtete Signaltransduktion wichtig (Cooper et al., 2003; Jira et al., 2003; Kelley und Herman, 2001; Lewis et al., 2001; Mann und Beachy, 2000).

Bis zum NF Stadium 30 konnte ein stetiger Anstieg der Expression von LRPAP1 nachgewiesen werden. Danach (NF Stadium 36 und 40) kommt es zu keiner Reduzierung der Expression. Dies deutet darauf hin, dass LRPAP1 auch über die Larvalentwicklung hinaus eine funktionelle Rolle für dessen Vielzahl an Liganden spielt. Zur Kontrolle und Quantifizierung der LRPAP1-Expression wurde in unseren Versuchen die Expression der Ornithindecaboxylase bestimmt, da deren Expressionsniveau in den frühen Embryonalstadien des *Xenopus laevis* im Vergleich zu Histon H4 weniger variiert (Heasman et al., 2000; Sindelka et al., 2006).

In zusätzlich durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen im adulten Frosch konnten Transkripte von LRPAP1, mit Ausnahme der Muskulatur, in Geweben aller drei Keimblätter

nachgewiesen werden (Abb. 11). Die stärkste Expression zeigte sich dabei in der Niere, dem Gehirn und der Leber.

Die Analyse der Expression mittels Whole mount *in situ* Hybridisierung hat, auch wenn sie weniger sensitiv als eine RT-PCR ist, den Vorteil, dass das zeitliche und räumliche Genexpressionsmuster gleichzeitig beurteilt werden kann. Hierbei zeigt sich im NF Stadium 24 eine erste schwache, ab NF Stadium 26 (Abb. 13) deutlich zu erkennende Expression von LRPAP1 im Bereich der Vornierentubuli. Interessanterweise beginnt die Expression damit fast zeitgleich zur Expression der Na,K-ATPase, welche im NF Stadium 26 beginnt und eine der Schlüsselkomponenten für die Transportvorgänge innerhalb der Niere sowie für die Homöostase des Wasserhaushaltes ist (Eid und Brandli, 2001). Während der Entwicklung der Vorniere des *Xenopus* zeigen sich erste histologische Anzeichen im NF Stadium 21, obwohl schon im NF Stadium 12,5 Zellen des intermediären Mesoderms unterhalb der Somiten 3 bis 5 sich formieren, um später die Vornierenanlage zu bilden (Carroll et al., 1999; Carroll und Vize, 1999; Hausen und Riebesell, 1991; Vize et al., 1997). Damit lässt sich LRPAP1 bereits während der frühen Nierenentwicklung nachweisen. Weitere Orte der Transkription von LRPAP1 konnten im Bereich der Augen- und Hirnanlagen und in den Somiten nachgewiesen werden. Ebenso zeigt sich bis NF Stadium 40 im Bereich der Ohranlage eine schwache Expression. Im Gegensatz zum adulten Frosch konnte keine intestinale Expression bis zum NF Stadium 40 nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen histologischer Untersuchungen, nach welchen die wesentliche Differenzierung der intestinalen Epithelien im *Xenopus* nicht vor dem NF Stadium 45/46 stattfindet (Chalmers und Slack, 1998).

Um die Expression von LRPAP1 innerhalb der Vornierentubuli genauer zu beschreiben und dabei der Frage nachzugehen, ob LRPAP1 auf spezielle Tubulusabschnitte beschränkt ist, wurden weitere Whole mount *in situ* Hybridisierungen mit Doppelfärbungen durchgeführt. Als Grundlage dazu dienten die Untersuchungen von Reggiani et al. 2007 und Raciti et al. 2008, welche in einer umfangreichen Genexpressionsanalyse von Transportproteinen (sogenannte *solute carrier*; slc) segment-spezifische Vornierenmarker bestimmt haben.

Es konnte in unseren Untersuchungen gezeigt werden, dass LRPAP1 in allen drei Abschnitten des proximalen Tubulussystems der Vorniere des *Xenopus laevis* exprimiert ist. Dies deckt sich mit Untersuchungen in der Maus (Kounnas et al., 1994). Zusätzlich konnte dabei nachgewiesen werden, dass LRPAP1 sowohl mit Megalin als auch mit LRP1 während der Entwicklung ko-exprimiert ist (Kounnas et al., 1994). Dies weist darauf hin, dass eine anatomisch-funktionelle Beziehung von LRPAP1 zu seinen Bindungspartnern existiert.

5.3 LRPAP1 ist nicht essentiell für die embryonale (Nieren-) Entwicklung

In den entwicklungsphysiologischen Prozessen des *Xenopus laevis* spielen, wie oben bereits beschrieben, u.a. Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie eine entscheidende Rolle. Ein Beispiel dafür ist Megalin, ein Ligand von LRPAP1, welcher eine wichtige Rolle bei der Bildung von Gehirnstrukturen spielt (Spoelgen et al., 2005; Wicher et al., 2005; Willnow et al., 1996a). Durch Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass viele Entwicklungsanomalien, welche auf Störungen des Hh-Signalwegs beruhen, denen von Megalin-defizienten Mäusen ähneln. Dabei treten vor allem ZNS-Fehlbildungen auf (McCarthy und Argraves, 2003; Willnow et al., 1996a). Dies lässt die Vermutung zu, dass Megalin einen regulatorischen Einfluss auf den Hh-Signalweg hat (Herz und Bock, 2002). Ein weiteres Beispiel sind LRP5 und LRP6, ebenso Liganden von LRPAP1, welche Schlüsselbestandteile des Wnt-Signalweges sind. Die Wnt-Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung entwicklungsphysiologischer Prozesse, von der Strukturierung des Embryos und der Bildung von Geweben und unterschiedlichen Zell-Typen bis hin zur Regulierung der Zellbewegung, der Polarität und Achsformierung sowie der Leitung von Axonen und Bildung von Synapsen (Logan und Nusse, 2004; Moon et al., 2004; Packard et al., 2003; Strutt, 2003; Veeman et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einige Gene des Wnt-Signalwegs in der Krankheits- und Tumorentstehung involviert sind und sich damit mögliche neue therapeutische Angriffspunkte ergeben (Moon et al., 2004).

Um die Frage zu beantworten, ob ein Funktionsverlust von LRPAP1 einen Einfluss auf die (Nieren-) Entwicklung von *Xenopus laevis* hat, wurde mit Hilfe von LRPAP1 spezifischen *antisense* Oligonukleotiden (sogenannten Morpholinos), welche in das Zweizellstadium heranwachsender *Xenopus laevis* Embryonen injiziert wurden, eine Inhibierung der Translation herbeigeführt. Die Embryogenese des Frosches bietet den Vorteil, dass später die injizierte Seite des Embryos mit der nicht injizierten Seite, welche auch als Kontrolle einer erfolgreichen Injektion dient, verglichen werden kann.

Wie in den Abb. 22 bis 26 zu sehen ist, konnten nach erfolgreicher Inhibierung der Proteinsynthese keinerlei phänotypische Unterschiede zu Wildtyp-Embryonen festgestellt werden. Es kam weder zu einer höheren Mortalitätsrate noch zu auffälligen anatomischen oder morphologischen Veränderungen der injizierten Embryonen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Studien an LRPAP1-defizienten Mäusen, die ebenfalls nicht von ihren Wildtypen zu unterscheiden waren. Interessanterweise konnte bei diesen LRPAP1 (-/-) Mäusen zusätzlich beobachtet werden, dass sowohl die Expression von LRP1 als auch die von

Megalin signifikant vermindert ist. Hierbei war die Expression von LRP1 um 75%, die von Megalin um 77% vermindert (Birn et al., 2000; Willnow et al., 1995). Ebenso führte das Fehlen von LRPAP1 zu einer Reduktion der Megalinexpression in der Schilddrüse, was Störungen der Thyreoglobulinsekretion und eine Erhöhung des TSH zur Folge hatte (Lisi et al., 2006).

Dies lässt die Vermutung zu, dass LRPAP1 zwar nicht für die embryonale Entwicklung benötigt wird, aber wie bereits beschrieben, als Adapterprotein einer Vielzahl von Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie für die Funktion von verschiedenen Organsystemen und Stoffwechselwegen von Bedeutung ist. Dabei spielt vor allem die Niere eine Rolle, denn in den proximalen Tubulussegmenten ist Megalin für die Rückresorption verschiedenster Moleküle von zentraler Bedeutung (Lehste et al., 1999; Lehste et al., 2003) und soll auch als Selenoproteinrezeptor fungieren (Chiu-Ugalde et al., 2010; Olson et al., 2008). Zudem ist Megalin in den proximalen Tubuli der Niere u.a. für die Rückresorption bereits filtrierter Vitamin D Metabolite essentiell. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von LRPAP1 neben der deutlich verminderten Megalinexpression in der Vorniere auch eine veränderte Urin-Proteinzusammensetzung der Mausembryonen zur Folge hat. Dabei konnte eine vermehrte Ausscheidung von α -Amylase sowie des Vitamin-D-bindenden Proteins nachgewiesen werden, was eine veränderte Proteinreabsorption in der Vorniere vermuten lässt (Birn et al., 2000; Lisi et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass es nach einem *knockdown* von LRPAP1 zu keinen morphologischen Veränderungen in Maus und *Xenopus* kommt, aber die Embryonen im Gegensatz dazu bei einem *knockdown* der Adapterproteine LRP6 oder Megalin schon früh sterben und schwerwiegende Schäden an den Nieren und dem Gehirn nachzuweisen sind (Fujino et al., 2003; Herz et al., 1992; Herz et al., 1993; Pinson et al., 2000; Willnow et al., 1996a), könnte sein, dass es neben LRPAP1 noch andere Proteine gibt, die die Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie binden und ähnliche Funktionen haben wie LRPAP1 (sogenannte Genredundanz). Am Beispiel von Megalin gibt es dafür einen Hinweis, denn LRPAP1 blockiert die Bindung aller bekannten Liganden von Megalin (Gliemann, 1998) mit der Ausnahme von Insulin (Orlando et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass ein ähnlicher Mechanismus oder aber andere regulatorische Proteine existieren, welche die frühzeitige Interaktion der Rezeptoren mit deren Liganden während der Reifung, der Modifizierung und dem Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat verhindern (Birn et al., 2000). Eines dieser Proteine könnte möglicherweise MESD (*Mesoderm Development Candidate 2*) sein. Es ist genau wie LRPAP1 ein ER-ständiges Chaperon, welches die

Proteinfaltung sowohl von LRP5/LRP6 als auch von Megalin sowie deren korrekte Expression auf der Zelloberfläche unterstützt (Koduri und Blacklow, 2007; Lighthouse et al., 2011). Lighthouse et al. 2011 konnten allerdings zeigen, dass MESD (-/-) Mäuse im Gegensatz zu LRPAP1 (-/-) Mäusen nicht fruchtbar und nicht überlebensfähig sind. Daher ist anzunehmen, dass MESD bei der Proteinfaltung und Rezeptorreifung eine entscheidendere Rolle spielt als LRPAP1. Es wird sogar angenommen, dass die LRPAP1-Funktion von der MESD-vermittelten Proteinfaltung der β -Propeller/EGF Domäne von Megalin abhängig sein könnte und sich LRPAP1 erst durch diese Faltung von der LDL-A Domäne ablöst (Jensen et al., 2009; Lighthouse et al., 2011). Dazu scheinen weitere Untersuchungen nötig zu sein.

5.4 Klinischer Bezug und aktuelle Forschung

Ein Beispiel für die mögliche klinische Relevanz von LRPAP1 lässt sich anhand seiner Funktion als Adapterprotein von LRP1 zeigen. Wie bereits bekannt spielt LRP1 in der Zellbiologie, im Lipoproteinmetabolismus und beim Abbau wichtiger Proteasen im Rahmen der Blutgerinnung und Fibrinolyse eine bedeutende Rolle (Herz und Strickland, 2001). Zudem bindet und vermittelt es die Endozytose einer Vielzahl wichtiger Liganden, unter anderem den Alpha-2-Makroglobulin-Protease-Komplex, den gewebspezifischen Plasminogen-Aktivator, den Urokinase Plasminogen-Aktivator, sowie verschiedenste Toxine, wie zum Beispiel das *Pseudomonas* Enterotoxin A (Sarti et al., 2000; Strickland et al., 2002). Weitere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass LRP1 eine bedeutende Rolle für die Intaktheit der Gefäßwände (Boucher et al., 2003) sowie der Blut-Hirnschranke (Yepes et al., 2003) und bei der Phagozytose apoptotischer Zellen spielt (Gardai et al., 2005).

Des Weiteren ist LRP1 bei der Entstehung der Alzheimer Demenz beteiligt. LRP1 ermöglicht den Transport des Amyloid Precursor Proteins (APP) und reguliert dessen Umwandlung in das Amyloid- β (A β) Peptid (Cam und Bu, 2006; Pietrzik et al., 2002; Ulery et al., 2000). Zudem vermittelt es den A β -Stoffwechsel in Neuronen (Qiu et al., 1999), Gliazellen (Schenk et al., 1999; Wyss-Coray et al., 2003) und Hirngefäßen (Kanekiyo und Bu, 2009; Urmoneit et al., 1997). In diesem Zusammenhang hat in jüngster Zeit auch das Interesse der Forschung an LRPAP1 im Rahmen der Entstehung der Alzheimer Demenz wieder zugenommen. Es konnte gezeigt werden, dass LRPAP1 das Amyloid- β (A β) Peptid, welches durch seine Akkumulation und Aggregation einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat, spezifisch bindet (Bu et al., 2006; Jaeger und Pietrzik, 2008; Marzolo und Bu, 2009). Man vermutet, dass LRPAP1 bei der zellulären Aufnahme des Peptids beteiligt ist und damit auch potentiell Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer Demenz hat (Kanekiyo und Bu,

2009). Zudem konnte festgestellt werden, dass LRPAP1 im Cortex von Alzheimer Patienten signifikant vermindert ist. Dies scheint eine mögliche Gegenregulation des Körpers zu sein, die Umwandlung von APP in das A β -Peptid zu verringern (Provias und Jeynes, 2010). Somit scheint LRPAP1 ein interessantes Zielprotein bei der Erforschung der Ursachen dieser bis heute noch unheilbaren Erkrankung zu sein.

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass LRPAP1 auch im Rahmen der Entstehung der weit verbreiteten Kurzsichtigkeit über die durch LRP1 beeinflusste TGF- β -Aktivität beteiligt ist (Aldahmesh et al., 2013).

5.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit bildet einen Baustein in der Grundlagenforschung der embryonalen Nierenentwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von LRPAP1 zu keinen morphologischen Veränderungen des heranwachsenden *Xenopus laevis* Embryos führt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass LRPAP1 über dessen Funktion als Adapterprotein der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie einen essentiellen funktionellen Einfluss auf die Vorniere oder gar folgende Nierenstadien hat. Zudem stellt sich bei der Suche nach Redundanzen die Frage, ob andere Adapterproteine von Megalin und LRP5/6 oder gar MESD bei einem LRPAP1 *knockdown* kompensatorisch hochreguliert werden. Dies wären interessante Fragestellungen für weitere LRPAP1-Studien am Modellorganismus *Xenopus laevis*.

6. Zusammenfassung

Das *lipoprotein receptor-related protein associated protein 1* (LRPAP1) ist ein intrazelluläres Protein, welches als Chaperon für die Proteinfaltung und den Rezeptortransport zur Zelloberfläche für die Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie verantwortlich ist. Zwei dieser Mitglieder sind LRP5 und LRP6, welche als Schlüsselemente des Wnt-Signalweges unter anderem für die Entwicklung und Differenzierung der Vorniere des *Xenopus* von Bedeutung sind. Ein weiteres Mitglied ist Megalin, welches für die Bildung von Hirnstrukturen und die richtige Funktion von verschiedenen Organsystemen (u.a. der Niere) während der Embryogenese eine entscheidende Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von LRPAP1 während der Frühentwicklung des *Xenopus laevis* zu beschreiben. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob LRPAP1 eine essentielle Rolle in der Frühentwicklung der Vorniere spielt.

In RT-PCR-Studien konnte gezeigt werden, dass LRPAP1 in den Geweben aller drei Keimblätter exprimiert wird, vor allem aber in der Niere, dem Gehirn und der Leber. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass LRPAP1-Transkripte bereits im unbefruchteten Ei vorkommen. Diese maternalen Transkripte ließen sich bis zum Beginn der Gastrulation nachweisen. Erst ab dem Embryonalstadium 15 wurden wieder vermehrt LRPAP1-Transkripte gebildet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* Hybridisierungen belegen eine scharf begrenzte Expression von LRPAP1 innerhalb der Vorniere des heranwachsenden *Xenopus laevis* Embryos. Mit Hilfe von speziellen Nierensegmentmarkern, welche von Reggiani et al. 2007 und Raciti et al. 2008 im Rahmen einer umfangreichen Genexpressionsanalyse von Transportproteinen (sogenannte *solute carrier*; slc) bestimmt wurden, konnte die Expression von LRPAP1 in allen drei proximalen Vornierensegmenten nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer *loss-of-function* Untersuchung wurde durch die Injektion von *antisense* LRPAP1-Oligonukleotiden (sogenannte Morpholinos) die Proteinbiosynthese gehemmt. Dabei zeigten sich im Vergleich zur Normalentwicklung der Wildtypen weder Unterschiede in der Morphologie der Vorniere noch im Überleben der Embryonen. Daher lässt sich vermuten, dass LRPAP1 keinen Einfluss auf die Frühentwicklung der Vorniere von *Xenopus laevis* hat.

7. Literaturverzeichnis

- Aldahmesh,M.A., Khan,A.O., Alkuraya,H., Adly,N., Anazi,S., Al Saleh,A.A., Mohamed,J.Y., Hijazi,H., Prabakaran,S., Tacke,M., Al Khrashi,A., Hashem,M., Reinheckel,T., Assiri,A., und Alkuraya,F.S. (2013). Mutations in LRPAP1 Are Associated with Severe Myopia in Humans. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 313-320.
- Birn,H., Vorum,H., Verroust,P.J., Moestrup,S.K., und Christensen,E.I. (2000). Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* *11*, 191-202.
- Boucher,P., Gotthardt,M., Li,W.P., Anderson,R.G., und Herz,J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* *300*, 329-332.
- Brandli,A.W. (1999). Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. *Int. J. Dev. Biol.* *43*, 381-395.
- Bu,G. (2001). The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family. *Int. Rev. Cytol.* *209*, 79-116.
- Bu,G., Cam,J., und Zerbini,C. (2006). LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1086*, 35-53.
- Bu,G., Geuze,H.J., Strous,G.J., und Schwartz,A.L. (1995). 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J.* *14*, 2269-2280.
- Bu,G., Maksymovitch,E.A., Geuze,H., und Schwartz,A.L. (1994). Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 29874-29882.
- Bu,G. und Marzolo,M.P. (2000). Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc. Med.* *10*, 148-155.
- Cam,J.A. und Bu,G. (2006). Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. *Mol. Neurodegener.* *1*, 8.
- Carroll,T.J. und Vize,P.D. (1999). Synergism between Pax-8 and lim-1 in embryonic kidney development. *Dev. Biol.* *214*, 46-59.
- Carroll,T.J., Wallingford,J.B., und Vize,P.D. (1999). Dynamic patterns of gene expression in the developing pronephros of *Xenopus laevis*. *Dev. Genet.* *24*, 199-207.
- Chalmers,A.D. und Slack,J.M. (1998). Development of the gut in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* *212*, 509-521.
- Chiu-Ugalde,J., Theilig,F., Behrends,T., Drebes,J., Sieland,C., Subbarayal,P., Kohrle,J., Hammes,A., Schomburg,L., und Schweizer,U. (2010). Mutation of megalin leads to urinary loss of selenoprotein P and selenium deficiency in serum, liver, kidneys and brain. *Biochem. J.* *431*, 103-111.

- Christensen,E.I., Raciti,D., Reggiani,L., Verroust,P.J., und Brandli,A.W. (2008). Gene expression analysis defines the proximal tubule as the compartment for endocytic receptor-mediated uptake in the *Xenopus* pronephric kidney. *Pflugers Arch.* 456, 1163-1176.
- Cooper,M.K., Wassif,C.A., Krakowiak,P.A., Taipale,J., Gong,R., Kelley,R.I., Porter,F.D., und Beachy,P.A. (2003). A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat. Genet.* 33, 508-513.
- Davidson,G., Wu,W., Shen,J., Bilic,J., Fenger,U., Stannek,P., Glinka,A., und Niehrs,C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867-872.
- Davies,J.A. und Bard,J.B. (1998). The development of the kidney. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39, 245-301.
- Dong,Y., Lathrop,W., Weaver,D., Qiu,Q., Cini,J., Bertolini,D., und Chen,D. (1998). Molecular cloning and characterization of LR3, a novel LDL receptor family protein with mitogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 784-790.
- Drawbridge,J. und Steinberg,M.S. (1996). Morphogenesis of the axolotl pronephric duct: a model system for the study of cell migration in vivo. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 709-713.
- Eid,S.R. und Brandli,A.W. (2001). *Xenopus* Na,K-ATPase: primary sequence of the beta2 subunit and in situ localization of alpha1, beta1, and gamma expression during pronephric kidney development. *Differentiation* 68, 115-125.
- Eid,S.R., Terrettaz,A., Nagata,K., und Brandli,A.W. (2002). Embryonic expression of *Xenopus* SGLT-1L, a novel member of the solute carrier family 5 (SLC5), is confined to tubules of the pronephric kidney. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 177-184.
- Fisher,C.E. und Howie,S.E. (2006). The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev. Biol.* 296, 279-297.
- Fuentealba,R.A., Liu,Q., Kanekiyo,T., Zhang,J., und Bu,G. (2009). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 34045-34053.
- Fujino,T., Asaba,H., Kang,M.J., Ikeda,Y., Sone,H., Takada,S., Kim,D.H., Ioka,R.X., Ono,M., Tomoyori,H., Okubo,M., Murase,T., Kamataki,A., Yamamoto,J., Magoori,K., Takahashi,S., Miyamoto,Y., Oishi,H., Nose,M., Okazaki,M., Usui,S., Imaizumi,K., Yanagisawa,M., Sakai,J., und Yamamoto,T.T. (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 229-234.
- Gardai,S.J., McPhillips,K.A., Frasch,S.C., Janssen,W.J., Starefeldt,A., Murphy-Ullrich,J.E., Bratton,D.L., Oldenborg,P.A., Michalak,M., und Henson,P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334.
- Gliemann,J. (1998). Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol. Chem.* 379, 951-964.

- Goldstein,J.L., Brown,M.S., Anderson,R.G., Russell,D.W., und Schneider,W.J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* *1*, 1-39.
- Harland,R.M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* *36*, 685-695.
- Hausen und Riebesell (1991). The early development of *Xenopus laevis*. (Berlin: Springer Verlag).
- He,X., Semenov,M., Tamai,K., und Zeng,X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* *131*, 1663-1677.
- Heasman,J., Kofron,M., und Wylie,C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev. Biol.* *222*, 124-134.
- Heller,N. und Brandli,A.W. (1997). *Xenopus* Pax-2 displays multiple splice forms during embryogenesis and pronephric kidney development. *Mech. Dev.* *69*, 83-104.
- Hensey,C., Dolan,V., und Brady,H.R. (2002). The *Xenopus* pronephros as a model system for the study of kidney development and pathophysiology. *Nephrol. Dial. Transplant.* *17 Suppl 9*, 73-74.
- Hensey,C. und Gautier,J. (1998). Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev. Biol.* *203*, 36-48.
- Herz,J. und Bock,H.H. (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 405-434.
- Herz,J., Clouthier,D.E., und Hammer,R.E. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* *71*, 411-421.
- Herz,J., Couthier,D.E., und Hammer,R.E. (1993). Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* *73*, 428.
- Herz,J. und Strickland,D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest* *108*, 779-784.
- Hey,P.J., Twells,R.C., Phillips,M.S., Yusuke,N., Brown,S.D., Kawaguchi,Y., Cox,R., Guochun,X., Dugan,V., Hammond,H., Metzker,M.L., Todd,J.A., und Hess,J.F. (1998). Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* *216*, 103-111.
- Hollemann,T., Panitz F., und Pieler,T. (1998). In situ hybridization techniques with *Xenopus* embryos. In *A Comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos*, Richter J.D., ed. (Oxford: University Press).
- Hollemann,T., Schuh,R., Pieler,T., und Stick,R. (1996). *Xenopus* Xsal-1, a vertebrate homolog of the region specific homeotic gene spalt of *Drosophila*. *Mech. Dev.* *55*, 19-32.

- Houston,D.W. und Wylie,C. (2002). Cloning and expression of *Xenopus* Lrp5 and Lrp6 genes. *Mech. Dev.* 117, 337-342.
- Howland,R.B. (1916). On the Effect of Removal of the Pronephros of the Amphibian Embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2, 231-234.
- Hsieh,J.C., Lee,L., Zhang,L., Wefer,S., Brown,K., DeRossi,C., Wines,M.E., Rosenquist,T., und Holdener,B.C. (2003). *Mesd* encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell* 112, 355-367.
- Hussain,M.M. (2001). Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front Biosci.* 6, D417-D428.
- Jaeger,S. und Pietrzik,C.U. (2008). Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 15-25.
- Jensen,J.K., Dolmer,K., Schar,C., und Gettins,P.G. (2009). Receptor-associated protein (RAP) has two high-affinity binding sites for the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP): consequences for the chaperone functions of RAP. *Biochem. J.* 421, 273-282.
- Jira,P.E., Waterham,H.R., Wanders,R.J., Smeitink,J.A., Sengers,R.C., und Wevers,R.A. (2003). Smith-Lemli-Opitz syndrome and the *DHCR7* gene. *Ann. Hum. Genet.* 67, 269-280.
- Joiner,D.M., Ke,J., Zhong,Z., Xu,H.E., und Williams,B.O. (2013). LRP5 and LRP6 in development and disease. *Trends Endocrinol. Metab* 24, 31-39.
- Jones,C. und Chen,P. (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* 29, 120-132.
- Jones,E.A. (2005). *Xenopus*: a prince among models for pronephric kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 313-321.
- Kanekiyo,T. und Bu,G. (2009). Receptor-associated protein interacts with amyloid-beta peptide and promotes its cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 284, 33352-33359.
- Karow, M. Der Wnt/beta-Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und deren funktioneller Bedeutung bei Proliferation und Invasion. 1-124. 2008. Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie. 20-3-2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Katanaev,V.L., Ponzielli,R., Semeriva,M., und Tomlinson,A. (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* 120, 111-122.
- Kato,M., Patel,M.S., Levasseur,R., Lobov,I., Chang,B.H., Glass,D.A., Hartmann,C., Li,L., Hwang,T.H., Brayton,C.F., Lang,R.A., Karsenty,G., und Chan,L. (2002). *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* 157, 303-314.
- Kelley,R.I. und Herman,G.E. (2001). Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2, 299-341.

- Kelly,O.G., Pinson,K.I., und Skarnes,W.C. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 131, 2803-2815.
- Kim,D.H., Inagaki,Y., Suzuki,T., Ioka,R.X., Yoshioka,S.Z., Magoori,K., Kang,M.J., Cho,Y., Nakano,A.Z., Liu,Q., Fujino,T., Suzuki,H., Sasano,H., und Yamamoto,T.T. (1998). A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *J. Biochem.* 124, 1072-1076.
- Koduri,V. und Blacklow,S.C. (2007). Requirement for natively unstructured regions of mesoderm development candidate 2 in promoting low-density lipoprotein receptor-related protein 6 maturation. *Biochemistry* 46, 6570-6577.
- Korenberg,J.R., Argraves,K.M., Chen,X.N., Tran,H., Strickland,D.K., und Argraves,W.S. (1994). Chromosomal localization of human genes for the LDL receptor family member glycoprotein 330 (LRP2) and its associated protein RAP (LRPAP1). *Genomics* 22, 88-93.
- Kounnas,M.Z., Haudenschild,C.C., Strickland,D.K., und Argraves,W.S. (1994). Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo* 8, 343-351.
- Krieger,M. und Herz,J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601-637.
- Kyuno,J., Masse,K., und Jones,E.A. (2008). A functional screen for genes involved in *Xenopus* pronephros development. *Mech. Dev.* 125, 571-586.
- Lazic,A., Dolmer,K., Strickland,D.K., und Gettins,P.G. (2003). Structural organization of the receptor associated protein. *Biochemistry* 42, 14913-14920.
- Lechner,M.S. und Dressler,G.R. (1997). The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech. Dev.* 62, 105-120.
- Lee,D., Walsh,J.D., Migliorini,M., Yu,P., Cai,T., Schwieters,C.D., Krueger,S., Strickland,D.K., und Wang,Y.X. (2007). The structure of receptor-associated protein (RAP). *Protein Sci.* 16, 1628-1640.
- Lee,D., Walsh,J.D., Mikhailenko,I., Yu,P., Migliorini,M., Wu,Y., Krueger,S., Curtis,J.E., Harris,B., Lockett,S., Blacklow,S.C., Strickland,D.K., und Wang,Y.X. (2006). RAP uses a histidine switch to regulate its interaction with LRP in the ER and Golgi. *Mol. Cell* 22, 423-430.
- Leheste,J.R., Melsen,F., Wellner,M., Jansen,P., Schlichting,U., Renner-Muller,I., Andreassen,T.T., Wolf,E., Bachmann,S., Nykjaer,A., und Willnow,T.E. (2003). Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J.* 17, 247-249.
- Leheste,J.R., Rolinski,B., Vorum,H., Hilpert,J., Nykjaer,A., Jacobsen,C., Aucouturier,P., Moskaug,J.O., Otto,A., Christensen,E.I., und Willnow,T.E. (1999). Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am. J. Pathol.* 155, 1361-1370.

- Lewis,P.M., Dunn,M.P., McMahon,J.A., Logan,M., Martin,J.F., St Jacques,B., und McMahon,A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105, 599-612.
- Lighthouse,J.K., Zhang,L., Hsieh,J.C., Rosenquist,T., und Holdener,B.C. (2011). MESD is essential for apical localization of megalin/LRP2 in the visceral endoderm. *Dev. Dyn.* 240, 577-588.
- Lisi,S., Botta,R., Pinchera,A., Collins,A.B., Marcocci,C., und Marino,M. (2008). Kidney abnormalities in low density lipoprotein receptor associated protein knockout mice. *J. Endocrinol. Invest* 31, 57-61.
- Lisi,S., Botta,R., Pinchera,A., Collins,A.B., Refetoff,S., Arvan,P., Bu,G., Grasso,L., Marshansky,V., Bechoua,S., Hurtado-Lorenzo,A., Marcocci,C., Brown,D., McCluskey,R.T., und Marino,M. (2006). Defective thyroglobulin storage in LDL receptor-associated protein-deficient mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 290, C1160-C1167.
- Logan,C.Y. und Nusse,R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- Lynch,K. und Fraser,S.E. (1990). Cell migration in the formation of the pronephric duct in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 142, 283-292.
- MacDonald,B.T., Tamai,K., und He,X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9-26.
- Mann,R.K. und Beachy,P.A. (2000). Cholesterol modification of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 188-202.
- Mao,B. und Niehrs,C. (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302, 179-183.
- Mao,J., Wang,J., Liu,B., Pan,W., Farr,G.H., III, Flynn,C., Yuan,H., Takada,S., Kimelman,D., Li,L., und Wu,D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7, 801-809.
- Marzolo,M.P. und Bu,G. (2009). Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 191-200.
- Marzolo,M.P. und Farfan,P. (2011). New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biol. Res.* 44, 89-105.
- McCarthy,R.A. und Argraves,W.S. (2003). Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *J. Cell Sci.* 116, 955-960.
- McCarthy,R.A., Barth,J.L., Chintalapudi,M.R., Knaak,C., und Argraves,W.S. (2002). Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 25660-25667.
- McLaughlin,K.A., Roness,M.S., und Mercola,M. (2000). Notch regulates cell fate in the developing pronephros. *Dev. Biol.* 227, 567-580.

- Mobjerg,N., Larsen,E.H., und Jespersen,A. (2000). Morphology of the kidney in larvae of *Bufo viridis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J. Morphol.* 245, 177-195.
- Mokuno,H., Brady,S., Kotite,L., Herz,J., und Havel,R.J. (1994). Effect of the 39-kDa receptor-associated protein on the hepatic uptake and endocytosis of chylomicron remnants and low density lipoproteins in the rat. *J. Biol. Chem.* 269, 13238-13243.
- Moon,R.T., Kohn,A.D., De Ferrari,G.V., und Kaykas,A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691-701.
- Mueller W.A. und Hassel M. (2005). *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tieren.* (Berlin Heidelberg: Springer Verlag).
- Muller,U. und Brandli,A.W. (1999). Cell adhesion molecules and extracellular-matrix constituents in kidney development and disease. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22), 3855-3867.
- Munro,S. und Pelham,H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Nieuwkoop und Faber (1994). *Normal Table of Xenopus Laevis* (Daudin). (New York: Garland Publishing Inc).
- Obermoeller,L.M., Warshawsky,I., Wardell,M.R., und Bu,G. (1997). Differential functions of triplicated repeats suggest two independent roles for the receptor-associated protein as a molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 272, 10761-10768.
- Olson,G.E., Winfrey,V.P., Hill,K.E., und Burk,R.F. (2008). Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 6854-6860.
- Orlando,R.A. und Farquhar,M.G. (1994). Functional domains of the receptor-associated protein (RAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3161-3165.
- Orlando,R.A., Kerjaschki,D., Kurihara,H., Biemesderfer,D., und Farquhar,M.G. (1992). gp330 associates with a 44-kDa protein in the rat kidney to form the Heymann nephritis antigenic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 6698-6702.
- Orlando,R.A., Rader,K., Authier,F., Yamazaki,H., Posner,B.I., Bergeron,J.J., und Farquhar,M.G. (1998). Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1759-1766.
- Packard,M., Mathew,D., und Budnik,V. (2003). Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 113-120.
- Pelham,H.R. (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 15, 483-486.
- Pietrzik,C.U., Busse,T., Merriam,D.E., Weggen,S., und Koo,E.H. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J.* 21, 5691-5700.
- Pinson,K.I., Brennan,J., Monkley,S., Avery,B.J., und Skarnes,W.C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-538.

- Provias,J. und Jeynes,B. (2010). Immunohistochemical detection of receptor-associated protein in normal human brain and Alzheimer's disease. *Patholog. Res. Int.* 2010, 173496.
- Pulkkinen,K., Murugan,S., und Vainio,S. (2008). Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis.* 4, 55-59.
- Qiu,Z., Strickland,D.K., Hyman,B.T., und Rebeck,G.W. (1999). Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta-amyloid peptide via low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J. Neurochem.* 73, 1393-1398.
- Raciti,D., Reggiani,L., Geffers,L., Jiang,Q., Bacchion,F., Subrizi,A.E., Clements,D., Tindal,C., Davidson,D.R., Kaissling,B., und Brandli,A.W. (2008). Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping. *Genome Biol.* 9, R84.
- Reggiani,L., Raciti,D., Airik,R., Kispert,A., und Brandli,A.W. (2007). The prepattern transcription factor *Irx3* directs nephron segment identity. *Genes Dev.* 21, 2358-2370.
- Roelink,H., Augsburger,A., Heemskerk,J., Korzh,V., Norlin,S., Altaba,A., Tanabe,Y., Placzek,M., Edlund,T., Jessell,T.M., und . (1994). Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.
- Sarti,M., Farquhar,M.G., und Orlando,R.A. (2000). The receptor-associated protein (RAP) interacts with several resident proteins of the endoplasmic reticulum including a glycoprotein related to actin. *Exp. Cell Res.* 260, 199-207.
- Saulnier,D.M., Ghanbari,H., und Brandli,A.W. (2002). Essential function of Wnt-4 for tubulogenesis in the *Xenopus* pronephric kidney. *Dev. Biol.* 248, 13-28.
- Saxen,L. und Sariola,H. (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatr. Nephrol.* 1, 385-392.
- Schenk,D., Barbour,R., Dunn,W., Gordon,G., Grajeda,H., Guido,T., Hu,K., Huang,J., Johnson-Wood,K., Khan,K., Kholodenko,D., Lee,M., Liao,Z., Lieberburg,I., Motter,R., Mutter,L., Soriano,F., Shopp,G., Vasquez,N., Vandevent,C., Walker,S., Wogulis,M., Yednock,T., Games,D., und Seubert,P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
- Sindelka,R., Ferjentsik,Z., und Jonak,J. (2006). Developmental expression profiles of *Xenopus laevis* reference genes. *Dev. Dyn.* 235, 754-758.
- Spoelgen,R., Hammes,A., Anzenberger,U., Zechner,D., Andersen,O.M., Jerchow,B., und Willnow,T.E. (2005). LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development* 132, 405-414.
- Strickland,D.K., Gonias,S.L., und Argraves,W.S. (2002). Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol. Metab* 13, 66-74.
- Strutt,D. (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* 130, 4501-4513.
- Tahinci,E., Thorne,C.A., Franklin,J.L., Salic,A., Christian,K.M., Lee,L.A., Coffey,R.J., und Lee,E. (2007). *Lrp6* is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* 134, 4095-4106.

- Tamai,K., Semenov,M., Kato,Y., Spokony,R., Liu,C., Katsuyama,Y., Hess,F., Saint-Jeannet,J.P., und He,X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.
- Tamai,K., Zeng,X., Liu,C., Zhang,X., Harada,Y., Chang,Z., und He,X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol. Cell* 13, 149-156.
- Tran,U., Pickney,L.M., Ozpolat,B.D., und Wessely,O. (2007). *Xenopus* Bicaudal-C is required for the differentiation of the amphibian pronephros. *Dev. Biol.* 307, 152-164.
- Ulery,P.G., Beers,J., Mikhailenko,I., Tanzi,R.E., Rebeck,G.W., Hyman,B.T., und Strickland,D.K. (2000). Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 275, 7410-7415.
- Urban,A.E., Zhou,X., Ungos,J.M., Raible,D.W., Altmann,C.R., und Vize,P.D. (2006). FGF is essential for both condensation and mesenchymal-epithelial transition stages of pronephric kidney tubule development. *Dev. Biol.* 297, 103-117.
- Urmoneit,B., Prikulis,I., Wihl,G., D'Urso,D., Frank,R., Heeren,J., Beisiegel,U., und Prior,R. (1997). Cerebrovascular smooth muscle cells internalize Alzheimer amyloid beta protein via a lipoprotein pathway: implications for cerebral amyloid angiopathy. *Lab Invest* 77, 157-166.
- Veeman,M.T., Axelrod,J.D., und Moon,R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5, 367-377.
- Vize,P.D. (2003). The chloride conductance channel CIC-K is a specific marker for the *Xenopus* pronephric distal tubule and duct. *Gene Expr. Patterns.* 3, 347-350.
- Vize,P.D., Jones,E.A., und Pfister,R. (1995). Development of the *Xenopus* pronephric system. *Dev. Biol.* 171, 531-540.
- Vize,P.D., Seufert,D.W., Carroll,T.J., und Wallingford,J.B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* 188, 189-204.
- Wehrli,M., Dougan,S.T., Caldwell,K., O'Keefe,L., Schwartz,S., Vaizel-Ohayon,D., Schejter,E., Tomlinson,A., und DiNardo,S. (2000). *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527-530.
- Wessely,O. und Tran,U. (2011). *Xenopus* pronephros development-past, present, and future. *Pediatr. Nephrol.* 26, 1545-1551.
- Wicher,G., Larsson,M., Rask,L., und Aldskogius,H. (2005). Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-2/megalin is transiently expressed in a subpopulation of neural progenitors in the embryonic mouse spinal cord. *J. Comp Neurol.* 492, 123-131.
- Wild,W., Pogge,v.S., Nastos,A., Senkel,S., Lingott-Frieg,A., Bulman,M., Bingham,C., Ellard,S., Hattersley,A.T., und Ryffel,G.U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4695-4700.

- Willnow,T.E., Armstrong,S.A., Hammer,R.E., und Herz,J. (1995). Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4537-4541.
- Willnow,T.E., Goldstein,J.L., Orth,K., Brown,M.S., und Herz,J. (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* 267, 26172-26180.
- Willnow,T.E., Hilpert,J., Armstrong,S.A., Rohlmann,A., Hammer,R.E., Burns,D.K., und Herz,J. (1996a). Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 8460-8464.
- Willnow,T.E., Rohlmann,A., Horton,J., Otani,H., Braun,J.R., Hammer,R.E., und Herz,J. (1996b). RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* 15, 2632-2639.
- Wu, Huiyuan. The function of a newly identified retinal homeobox-containing gene, *Xenopus RxL* in retinal development. 1-106. 2008. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften. 29-8-2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Wyss-Coray,T., Loike,J.D., Brionne,T.C., Lu,E., Anankov,R., Yan,F., Silverstein,S.C., und Husemann,J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453-457.
- Yepes,M., Sandkvist,M., Moore,E.G., Bugge,T.H., Strickland,D.K., und Lawrence,D.A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J. Clin. Invest* 112, 1533-1540.
- Zeng,X., Tamai,K., Doble,B., Li,S., Huang,H., Habas,R., Okamura,H., Woodgett,J., und He,X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-877.
- Zhou,X. und Vize,P.D. (2004). Proximo-distal specialization of epithelial transport processes within the *Xenopus* pronephric kidney tubules. *Dev. Biol.* 271, 322-338.
- Zhou,X. und Vize,P.D. (2005a). Amino acid cotransporter SLC3A2 is selectively expressed in the early proximal segment of *Xenopus* pronephric kidney nephrons. *Gene Expr. Patterns.* 5, 774-777.
- Zhou,X. und Vize,P.D. (2005b). Pronephric regulation of acid-base balance; coexpression of carbonic anhydrase type 2 and sodium-bicarbonate cotransporter-1 in the late distal segment. *Dev. Dyn.* 233, 142-144.

Thesen der Dissertation

1. LRPAP1 ist ubiquitär in Geweben aller drei Keimblätter von *Xenopus laevis* exprimiert.
2. LRPAP1 wird im *Xenopus laevis* maternal exprimiert.
3. Die zygotische Expression von LRPAP1 im *Xenopus laevis* beginnt ab dem Embryonalstadium 15.
4. LRPAP1 wird im *Xenopus laevis* in allen drei Vornierentubulus-Abschnitten exprimiert.
5. LRPAP1 ist nicht essentiell für die Frühentwicklung der Vorniere im *Xenopus laevis*.

Curriculum vitae

Name	Florian Gaul
Geburtsdatum/-ort	03.06.1983 in Halle (Saale)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	katholisch
Kontakt	Gustav-Freytag-Str. 20, 04277 Leipzig Florian.gaul83@gmail.com Tel.: 0176/63182697

Schulausbildung

1990 - 1994	Paulus-Grundschule Halle
1994 - 2003	Johann-Gottfried-Herder Gymnasium Halle Abschluss Allgemeine Hochschulreife, Note 2,0

Zivildienst

09/2003 - 06/2004	Anästhesiologische Intensivstation, Universitätsklinikum Halle
-------------------	--

Studium

2004 - 2010	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
12/2010	Approbation Humanmedizin

Ärztliche Tätigkeit

03/2011 - 05/2011	Freiwilligen-Arbeit als „Visiting Doctor“ im Child Surgery Center, Phnom Penh, Kambodscha
10/2011 - 12/2011	Tauch- und Hotelarzt im Kuramathi-Island Resort, Malediven (vermittelt durch Resortdoc GmbH, Dr. med. H. Liedtke, Halle)
Seit 01/2012	Assistenzarzt, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Carl-von-Basedow-Klinikum Saalekreis, Merseburg (Chefarzt Dr. Felix Göbel)
Seit 09/2012	Mannschaftsarzt Chemie Volley Mitteldeutschland (1. Bundeliga Volleyball)

Weiterbildung

10/2012	BDC-Kurs Basischirurgie - Common Trunk (veranstaltet vom BDC, Bund Deutscher Chirurgen)
12/2012	Extremitätenkurs für Ärzte (E1 + E2) der ÄMM (Deutsche Gesellschaft für manuelle Medizin)
05/2013	„Taucherarzt“-Diplom (Diving Medicine Physician) der GTÜM (Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin)
10/2013	Sportorthopädie-Kongress (veranstaltet durch die Firma MEDI)
11/2013	Strahlenschutz „Grundkurs“
01/2014	Arthroskopie-Kurs A, Arosa (veranstaltet durch die AGA, Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie)

Weitere berufliche Erfahrungen

seit 1999	Staatlich geprüfter DTB-C-Trainer für Tennis-Breiten- und Leistungssport in diversen Vereinen im Raum Halle-Leipzig
10/2006 - 07/2009	Vorsitzender von „Mit Sicherheit Verliebt e.V.“, Standort Halle AIDS-Präventionsprojekt von Medizinstudenten für Schüler
2007 - 2011	Deutschlandweite Reisemedizin- und Impfberatung sowie Organisation internationaler Krankenrücktransporte für den ADAC, Dienstleistungscenter (DLC) Halle

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde, ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Leipzig, den 23.02.2015

Florian Gaul

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Florian Gaul, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Leipzig, den 23.02.2015

Florian Gaul

Danksagung

Zuerst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Hollemann für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit auf dem spannenden und interessanten Gebiet der Entwicklungsbiologie anzufertigen. Seine wertvollen Tips trugen sehr zum Fortschritt der Arbeit bei.

Spezieller Dank gilt Frau Dr. Astrid Vess für Ihre exzellente wissenschaftliche Betreuung. Sie stand mir in allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Juliane Herfurth und Undine Ziese für das praktische Anlernen bedanken. Ob bei technischen Verfahren, bei der Eiergewinnung oder beim Injizieren der *Xenopus* Embryonen; es war immer eine große Freude mit ihnen zu arbeiten.

Den weiteren Mitgliedern der AG Hollemann bestehend aus Dr. Enrico Jandt, Dr. Herbert Neuhaus, Dr. Doerte Adolph, Dr. Hui-Yuan Wu, Marlen Metzsig, Anne Corsing und Swantje Ihle danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die lehrreichen und lustigen Stunden im Labor.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder Stephan und besonders meiner Freundin Susanne Schuster für ihre nie nachlassende Unterstützung während der Höhen und Tiefen meiner Zeit im Labor und auch danach beim Verfassen dieser Arbeit parallel zum klinischen Alltag danken. Ohne sie wäre ich wohl so manches Mal ins Straucheln geraten.